

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM MELIPONA:
COMPOSTOS VOLÁTEIS, RESPOSTA
ELETROANTENOGRÁFICA E SENSILAS OLFATIVAS**

JOSSIMARA NEIVA DE JESUS

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JANEIRO – 2022**

COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM MELIPONA: COMPOSTOS VOLÁTEIS, RESPOSTA ELETROANTENOGRÁFICA E SENSILAS OLFATIVAS

Jossimara Neiva de Jesus

Zootecnista

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientadora: Prof^a Dr^a Cândida Maria Lima Aguiar

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Mesquita

Coorientador: Prof. Dr. Frederico de Medeiros Rodrigues

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JANEIRO – 2022**

FICHA CATALOGRÁFICA

J58c

Jesus, Jossimara Neiva de.

Comportamento higiênico em melipona: compostos voláteis, resposta eletroantegráfica e sensilas olfativas / Jossimara Neiva de Jesus._ Cruz das Almas, BA, 2022.

126f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Doutorado em Ciências Agrárias.

Orientadora: Prof. Dra. Cândida Maria Lima Aguiar. Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho. Coorientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Mesquita. Coorientador: Prof. Dr. Frederico de Medeiros Rodrigues.

1.Abelha – Comportamento. 2.Abelha – Saúde – Análise.
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 638.11

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB. Responsável pela Elaboração Antonio Marcos Sarmento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615). Os dados para Catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM MELIPONA: COMPOSTOS VOLÁTEIS,
RESPOSTA ELETROANTENOGRÁFICA E SENSILAS OLFATIVAS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE
DE JOSSIMARA NEIVA DE JESUS**

Realizada em 28 de Janeiro de 2022

Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Interno (Presidente)

Profa. Dra. Gení da Silva Sodré
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Interno

Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Interno

Dra. Marilene Fancelli
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa
Examinador Externo

Dra. Kelly Barbosa da Silva
Pesquisadora Autônoma
Examinador Externo

*Dedico este trabalho aos meus pais
que persistiram comigo para a
realização desse sonho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a coordenação do programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) pela oportunidade para minha formação.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo que tornou possível a realização dessa Pós-graduação.

Ao Centro Tecnológico Agropecuário da Bahia (CETAB) por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Resíduos e Contaminantes para análises químicas.

A minha Orientadora do Curso de Doutorado Dr^a Candida Maria Lima Aguiar agradeço pela confiança e por acreditar nesse projeto.

Ao coorientador professor Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho agradeço pela oportunidade de aprendizado durante toda minha trajetória científica e por buscar comigo soluções para as dificuldades durante esse processo.

Agradeço aos coorientadores Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Mesquita e Dr. Frederico de Medeiros Rodrigues por todo ensinamento sobre esse universo complexo da química durante a execução dos experimentos.

Ao Dr. Johnnatan Duarte de Freitas pelas microfotografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura no Instituto Federal de Alagoas (IFAL).

A Dr^a Kelly Barbosa da Silva agradeço por compartilhar preciosos conhecimentos sobre eletroantenografia, e por toda paciência e apoio.

Agradeço a Lorena Correia, companheira durante os experimentos, sempre motivando e buscando junto comigo soluções para as dificuldades que tivemos nesse processo.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa INSECTA pelos conhecimentos compartilhados.

Agradeço a Deus pela vida e por sustar minhas forças em todos os momentos.

Agradeço imensamente aos meus pais José Xavier de Jesus e Maria das Graças Neiva de Jesus por todo amor, zelo e apoio em mais essa conquista.

Agradeço a toda minha família, em especial a Adriana Neiva, Lucas Almeida e Nilva Xavier pelo apoio constante e preciosas orações que trouxeram confiança e serenidade. Agradeço a Adelaide Xavier por me receber tão bem em sua casa no início dos experimentos em Salvador.

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

1. REFERENCIAL TEÓRICO	01
1.1 <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> e <i>Melipona scutellaris</i>	01
1.2 Meliponicultura.....	04
1.3 Defesa das colônias.....	04
1.3.1 <i>Bases genéticas e herdabilidade para o comportamento higiênico</i>	07
1.3.2 <i>Fatores que influenciam o comportamento higiênico</i>	08
1.4 Ecologia química.....	10
1.4.1 <i>Extração e identificação de compostos voláteis</i>	13
1.4.2 <i>Morfologia olfativa</i>	15
1.4.3 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	17
1.4.4 <i>Eletroantenografia (EAG)</i>	18
2. ARTIGO I	
COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM ABELHAS SEM FERRÃO.....	31
3. ARTIGO II	
COMPOSTOS VOLÁTEIS EMANADOS DE CRIAS DE <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> LEPELETIER, 1836 (APIDAE, MELIPONINAE) MORTAS POR DIFERENTES TÉCNICAS PARA ESTUDO DO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO.....	47
4. ARTIGO III	
RESPOSTA ELETROANTENOGRÁFICA DE <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> LEPELETIER, 1836 (APIDAE, MELIPONINAE) AOS VOLÁTEIS DE LARVAS MORTAS	78
5. ARTIGO IV	
SENSILAS OLFATIVAS EM OPERÁRIAS DE <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> LEPELETIER, 1836 (APIDAE, MELIPONINAE) REMOVEDORAS E NÃO REMOVEDORAS DE CRIAS MORTAS.....	96
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	111

COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM MELIPONA: COMPOSTOS VOLÁTEIS, RESPOSTA ELETROANTENOGRÁFICA E SENSILAS OLFATIVAS

Autora: Jossimara Neiva de Jesus

Orientadora: Profa. Dra. Cândida Maria Lima Aguiar

Resumo: O comportamento higiênico (CH) das abelhas trata da capacidade de detecção e remoção de crias mortas, doentes ou parasitadas pelas abelhas adultas, e aumenta os índices de sanidade das colônias. Esse estudo apresentou (i) o estudo de caso do comportamento higiênico em *Melipona scutellaris* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*; (ii) investigou a composição química dos compostos voláteis emanados das fases larval e pupal mortas por meio de diferentes técnicas; (iii) analisou a resposta eletroantegráfica das abelhas adultas frente aos compostos emanados de larvas mortas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*; (iv) verificou o padrão das sensilas olfativas de operárias removedoras e não removedoras de crias mortas. Os resultados desse estudo indicam que existe diferença no perfil químico em razão da técnica de indução da morte utilizada para avaliar o CH das colônias, bem como do estágio de desenvolvimento da cria. A resposta eletroantegráfica das antenas das abelhas, indica maior número de repetições para um composto no extrato natural, que foi sugerido por CG-EM como 1-hexanol. O estudo das sensilas olfativas indicou as sensilas tricoides do tipo 1 e tipo 4, além da sensila placodea como as mais abundantes em antenas de *M. q. anthidioides*. Especificamente para o comportamento higiênico, os resultados mostram que não é a quantidade ou tamanho das sensilas que reflete a capacidade olfativa das abelhas em higiênicas. Os resultados dessa pesquisa poderão contribuir para melhor compreensão do comportamento higiênico e suas interações em abelhas sem ferrão, mais especificamente do gênero *Melipona*, uma vez que ainda são insuficientes os estudos em abelhas desse gênero. Além disso, essas informações poderão auxiliar no desenvolvimento de estratégias de manejo que possam prevenir futuras perdas de colônias de abelhas sem ferrão associadas à sanidade.

Palavras-chave: *Melipona quadrifasciata anthidioides*; *Melipona scutellaris*; Colônias higiênicas; Sanidade; Semioquímicos

HYGIENIC BEHAVIOR IN MELIPONA: VOLATILE COMPOUNDS, ELECTROANTENOGRAPHIC RESPONSE AND OLFACTIVE SENSILES

Author: Jossimara Neiva de Jesus

Adviser: Prof^a Dr^a Cândida Maria Lima Aguiar

Abstract: The hygienic behavior of bees is related to the ability to detect and remove dead, sick, or parasitized broods by adult bees, increasing the health rates of colonies. This study (i) presented the case study of hygienic behavior in *Melipona scutellaris* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*; (ii) investigated the chemical composition of volatile compounds emanating from the larval and pupal stages killed by different techniques; (iii) analyzed the electroantennographic response of adult bees to compounds emanating from dead larvae of *Melipona quadrifasciata anthidioides*; (iv) verified the pattern of olfactory sensilla of hygienic and non-hygienic dead brood removal. The results indicate differences in the chemical profile due to the death induction technique used to assess the hygienic behavior and the developmental stage of the offspring. The electroantennographic response of bee antennae indicates a higher number of repetitions for a compound in the natural extract, which was suggested as 1-hexanol by GC-MS. The study of olfactory sensilla demonstrates type 1 and type 4 trichoid sensilla, along with the placodean sensilla, as the most abundant in *M. q. anthidioids*. Specifically for hygienic behavior, the results indicate that it is not the number or size of sensilla that reflects the olfactory capacity of hygienic bees. The results may contribute to a better understanding of hygienic behavior and their interactions in stingless bees, specifically genus *Melipona*, since studies on bees of this genus are still insufficient. In addition, this information may help the development of management strategies that can prevent future losses of stingless bees colonies associated with sanity.

Keywords: *Melipona quadrifasciata anthidioides*; *Melipona scutellaris*; Hygienic colonies; Sanity; Semiochemicals

1. REFERENCIAL TEÓRICO

As abelhas despertam curiosidades e inspiram pesquisas em todo o mundo devido a sua organização, comportamento, qualidade dos produtos e principalmente pelo valioso serviço de polinização que realizam em praticamente todos os biomas, sendo consideradas fundamentais para manutenção da biodiversidade global (CHAMBÓ, 2016). A maioria das plantas com flores depende da polinização, principalmente realizada por abelhas (OLLERTON; WINFREE; TARRANT, 2011). Além disso, estima-se que as abelhas sejam responsáveis pela polinização de 75% dos alimentos cultivados no mundo (POTTS *et al.*, 2016), enquanto no Brasil esse número chega a cerca de 89% (GIANNINI *et al.*, 2015).

Em todo o mundo são reconhecidas, aproximadamente, 20 mil espécies de abelhas (MICHENER, 2007). No Brasil foram identificadas cerca de 1.600 espécies, mas estima-se que esse número ultrapasse três mil espécies (PEDRO, 2014; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002). O grupo das abelhas sem ferrão tem distribuição mais restrita às regiões tropicais e subtropicais, mas com expressiva diversidade nas regiões neotropicais, com 400 espécies descritas (CAMARGO; PEDRO, 2013).

No Brasil, são catalogadas 244 espécies de abelhas sem ferrão, pertencentes a 27 gêneros (PEDRO, 2014), dentre eles, o gênero *Melipona* tem o maior número de espécies, sua ocorrência abrange a América do Sul até a América Central e México (CAMARGO; PEDRO, 2013; MICHENER, 2007) e vem se destacando com espécies de interesse econômico (VENTURIERI *et al.*, 2012), dentre elas a *Melipona quadrifasciata* Lepeletier e *Melipona scutellaris* 1836, tradicionalmente conhecidas como “mandaçaia” e “uruçu”, respectivamente (BRITO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

1.1 *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Melipona scutellaris*

A espécie *Melipona quadrifasciata* Lepeletier foi dividida em duas subespécies: *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Melipona quadrifasciata*

quadrifasciata, separadas devido à presença de três a cinco listras metasomais amarelas contínuas do 2º ao 5º segmento em operárias e machos de *M. q. quadrifasciata*, que são interrompidas em *M. q. anthidioides* (SCHWARZ, 1948).

A distribuição das subespécies ocorre em áreas geográficas bastante distintas sendo a *M. q. quadrifasciata* encontrada em Misiones na Argentina e sudeste do Paraguai. No Brasil ocorre desde o Rio Grande do Sul ao sul do Estado de São Paulo. A *M. q. anthidioides* é encontrada em regiões com temperaturas mais elevadas, desde o nordeste do Estado de São Paulo para o norte da Bahia até a porção oeste de Minas Gerais e a região central do estado de Goiás (BATALHA-FILHO *et al.*, 2009). Segundo esses autores, a distribuição de *M. q. anthidioides* está associada a áreas de maior altitude ao longo dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia. No Estado da Bahia, principalmente na região semiárida é marcante a presença de *M. q. anthidioides* devido ao clima e flora local (NUNES *et al.*, 2008).

A distribuição dessas subespécies em território brasileiro foi mais ampla, sendo relatada a ocorrência de *M. q. quadrifasciata* em Pernambuco e Paraíba, bem como de *M. q. anthidioides* nos estados de Alagoas e Sergipe (CAMARGO; PEDRO, 2013; MOURE; KERR, 1950). Isso pode estar relacionado com as alterações ambientais e também por fatores climáticos, como observado por Teixeira *et al.* (2018) que, modelando um cenário com aumento de 5 a 6 °C na temperatura global, concluíram que *M. q. anthidioides* terá maior potencial para adaptações, enquanto *M. q. quadrifasciata* sofrerá uma redução de habitats em quase todas as áreas atuais de distribuição. Entretanto, no estudo não foi prevista a influência das alterações antrópicas como a degradação e fragmentação do habitat, uso de pesticidas em culturas agrícolas e as práticas predatórias em abelhas sem ferrão, ainda realizadas em muitas regiões do Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2012; RAFFERTY, 2017; ROUBIK, 2018). *Melipona q. anthidioides* utiliza os locais preexistentes em árvores, cupinzeiros e cavidades no solo para nidificação, o que a torna vulnerável às modificações do ambiente.

A população de *M. q. anthidioides* varia de 300 a 400 abelhas por colônia (LINDAUER; KERR, 1960), no entanto em períodos de escassez de alimento sua população pode ser reduzida a alguns poucos indivíduos em torno da rainha.

A *Melipona scutellaris*, possui distribuição na faixa litorânea do estado do Rio Grande do Norte até o estado da Bahia. Nos estados de Pernambuco e Bahia, essa espécie também é encontrada nas áreas mais úmidas do interior (ALVES *et al.*, 2012). A *M. scutellaris* é considerada de grande importância ambiental e econômica na sua área de ocorrência, devido ao seu potencial produtivo, qualidade dos produtos e pela polinização das culturas de interesse agrícola e áreas de vegetação nativa (ALVES *et al.*, 2019).

As colônias de abelhas do gênero *Melipona* são formadas por quatro tipos de indivíduos: rainha fisiogástrica, rainha virgem ou “princesa”, operárias e zangões, que diferem por fatores genéticos e alimentares (AIDAR, 2010), e emergem de células idênticas, inclusive a rainha. As atividades executadas por esses indivíduos estão relacionadas principalmente a casta e idade: aos zangões compete a função de acasalar, não possuem estruturas morfológicas para a coleta de recursos florais (AIDAR, 2010).

A rainha é responsável pela postura de ovos, controle social e reprodutivo das operárias por meio de feromônios (VAN OYSTAEYEN, 2014). Cerca de 10% das fêmeas da colônia têm potencial genético para tornar-se rainha, são as princesas (KÄRCHER *et al.*, 2013; KERR, 1950), que, apesar de emergirem morfológicamente aptas ao acasalamento, não são atrativas para os zangões, isso depende da idade e da interação social durante a vida adulta (VEIGA; MENEZES; CONTRERA, 2017).

As operárias são responsáveis pela força de trabalho da colônia e transitam em diferentes funções de acordo com a idade (AIDAR, 2010), sendo as abelhas mais novas responsáveis pela nutrição das abelhas recém-emergidas, a seguir, cuidam da limpeza, arquitetura do ninho e manipulação de alimentos, guarda, e a última atividade realizada é o forrageamento para coleta de recursos tróficos e manutenção do ninho, embora haja plasticidade na execução das tarefas em decorrência das necessidades da colônia (NOGUEIRA-NETO, 1997).

1.2 Meliponicultura

A atividade que se destina a criação racional das abelhas sem ferrão é denominada Meliponicultura. No Brasil, essa atividade é desenvolvida em todo o território, com foco para comercialização de produtos, pesquisa e conservação das espécies. Dentre as espécies mais exploradas, merecem destaque a *M. q. anthidioides* e *M. scutellaris*, importantes tanto para a meliponicultura quanto para a manutenção da biodiversidade nas regiões onde tem ocorrência natural e ou são criadas (ALVES *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Apesar de importante, o crescimento da Meliponicultura e a proximidade de colônias manejadas de *Apis mellifera* aumentam os riscos de transmissão de patógenos (FÜRST *et al.*, 2014; VENTURIERI *et al.*, 2012). Os aspectos sanitários em abelhas sem ferrão são pouco estudados, possivelmente devido aos baixos níveis de doença observados, o que de acordo com Al Toufailia *et al.* (2016), não significa que não ocorram enfermidades nessas abelhas. Embora ocasionais, é possível identificar alterações nas colônias, falhas nos discos de cria, células deformadas e abelhas mortas na frente da caixa, sintomas que podem ser atribuídos aos pesticidas (SARTO *et al.*, 2014), mas também podem indicar danos causados por agentes patogênicos.

1.3 Defesa das colônias

Assim como observado para outras abelhas sociais, as abelhas sem ferrão dispõem de mecanismos de defesa para proteger suas colônias, tais como fisiológicos, anatômicos (LEONHARDT, 2017; SCHORKOPF *et al.*, 2009), produção de antibióticos (GRECO *et al.*, 2010), além de estratégias comportamentais como o comportamento higiênico (CH) (JESUS *et al.*, 2017), considerado de grande importância para manutenção dos níveis de sanidade das colônias (BIGIO; SCHÜRCH; RATNIEKS, 2013). Por meio do comportamento higiênico, as abelhas operárias identificam crias mortas ou doentes no interior das células e procedem sua remoção antes da proliferação do agente patogênico (SPIVAK; REUTER, 2001; WILSON RICH *et al.*, 2009).

Devido à importância dessa característica, desde 1994, pesquisadores da Universidade de Minnesota, nos Estados Unidos da América (EUA) produzem matrizes de *Apis mellifera* com linhagem higiênica que são distribuídas entre os apicultores, visando melhoria da sanidade das colônias, redução da aplicação de acaricidas e fungicidas no combate às pragas e doenças, bem como aumento da frequência de genes relacionados ao CH no ambiente (SPIVAK E REUTER, 2008), uma vez que a ocorrência natural de colônias com alto grau de higiene é baixa (AL TOUFAILIA *et al.*, 2018).

Para identificar as colônias com alta sensibilidade para a remoção de crias mortas, doentes ou parasitadas, foram desenvolvidos diversos métodos que têm sido relatados desde a década de 1960. O ponto em comum entre os métodos é a obtenção de crias mortas e a quantificação de remoção pelas abelhas da colônia. Diferem quanto à natureza do material (biológico ou não) utilizado para obtenção de crias mortas, o rigor e o propósito da avaliação. Em síntese, os bioensaios são divididos em quatro métodos (Quadro 1), revisados por Leclercq *et al.* (2018).

Tabela 1. Principais métodos para identificar colônias higiênicas em *Apis mellifera*

Método	Tratamento	Idade da cria	Recomendação de higiene	Referência
Inoculação	<i>Paenibacillus larvae</i>	Larva	Não informado	THOMPSON (1964)
	<i>Ascospaera apis</i>	Larva	Não informado	GILLIAM <i>et al.</i> (1983)
Infestação	<i>Varroa destructor</i>	Larva	Não informado	BOECKING; DRESCHER (1992); SCHÖNING <i>et al.</i> (2012)
Perfuração	Alfinete entomológico	Larva Pupa	>80% em 24 horas	NEWTON; OSTASIEWISKI (1986); GRAMACHO; GONÇALVES (1994)
Congelamento	Freezer (-20°C)	Larva Pupa	>95% em 48 horas	NEWTON <i>et al.</i> (1975); TABER (1982)

Nitrogênio líquido (-195°C)	Larva Pupa	>95% em 24 horas	SPIVAK; DOWNEY (1998); SPIVAK; REUTER (1998a).
-----------------------------	---------------	------------------	--

Para todos os métodos, recomenda-se a repetição do teste por no mínimo duas vezes, nas quais as colônias devem apresentar o mesmo resultado e consideradas higiênicas ou não higiênicas. Essa recomendação deve-se à variação do desempenho de remoção em função de variáveis climáticas, ambientais e da população da colônia (BIGIO; SCHÜRCH; RATNIEKS, 2013).

Apesar de existirem discussões acerca de qual método é mais eficiente, o método de perfuração e congelamento são os mais utilizados por criadores e pesquisadores para seleção de colônias resistentes às pragas e patógenos. O método de perfuração de cria consiste em perfurar as abelhas na idade de pupa dentro dos alvéolos por meio de um alfinete entomológico (NEWTON; OSTASIEWISKI, 1986) e como medida de avaliação, a colônia é considerada higiênica se a área de teste apresentar remoção superior a 80% dentro de 24 horas. Esse método é o mais usado, principalmente por ser econômico e de fácil realização, no entanto, ao violar o opérculo traz-se à superfície da célula fluidos corporais das crias mortas, o que pode estimular a percepção dos danos às crias, antecipando a sua remoção pelas operárias (GRAMACHO *et al.*, 1999). Além disso, não está padronizado o diâmetro do alfinete que produza o mínimo de dano ao opérculo, mas que garanta a morte da cria. Os pesquisadores têm utilizado alfinetes medindo entre 0,30 e 0,75 mm de diâmetro. Spivak; Downey (1998) observaram que 30% das crias sobreviveram quando utilizaram alfinete fino medindo 0,30 mm, já o alfinete medindo 0,75 mm utilizado por Panasiuk *et al.* (2008) aumentou o dano no opérculo e influenciou a quantidade de hemolinfa vazada. Büchler *et al.* (2013) indicaram o alfinete número 2 (0,45 mm), de forma a obter o equilíbrio entre a intensidade suficiente para sacrificar a cria, com o menor dano produzido no opérculo.

O método de congelamento de crias pode ser realizado colocando seções de favos contendo cria na idade de larva de último ínstar ou pupa de olho roxo em freezer ou utilizando nitrogênio líquido (N₂). O congelamento das áreas de cria é realizado colocando seções de favos de cria contendo, aproximadamente,

100 células em cada face do quadro (5 x 6 cm), em freezer (-20°C) durante 24 horas; posteriormente essas seções são devolvidas às respectivas colônias para avaliação do seu grau de comportamento higiênico (NEWTON CANTEWELL; BOURQUIN, 1975). Como critério de avaliação, uma colônia é considerada higiênica quando há remoção superior a 95% em 48 horas (TABER, 1982).

O congelamento das áreas de cria utilizando nitrogênio líquido foi proposto por Spivak; Gilliam (1998), a fim de reduzir a manipulação das áreas de teste para CH. Esse método consiste em delimitar uma área de cria com auxílio de um cilindro no qual será vertido o nitrogênio líquido para obtenção de crias mortas por congelamento. Após o descongelamento da área de cria o cilindro é retirado e a área devolvida à colônia. Após 24 horas, calcula-se o percentual de remoção de crias na área de teste, este deve ser superior a 95% para que a colônia seja considerada higiênica (SPIVAK; REUTER, 1998).

Devido aos avanços da ecologia química das abelhas, o método de congelamento, especialmente com o nitrogênio líquido, vem sendo preferencialmente utilizado por causar menos perturbações à colônia e conferir maior confiabilidade aos resultados (PIRES *et al.*, 2006; STANIMIROVIC *et al.*, 2008). Uma variação desse método foi proposta por Facchini *et al.* (2019), que consiste em combinar as metodologias de congelamento, ou seja, partes das áreas de cria são cortadas e imersas em nitrogênio líquido e, após descongeladas, são devolvidas à colônia de origem.

Para Leclercq *et al.* (2018) a escolha do método deve basear-se na relevância para o propósito da pesquisa, do programa de melhoramento e da praga ou patógeno a ser investigado.

1.3.1 Bases genéticas e herdabilidade para o comportamento higiênico

Rothenbuhler (1964), sugeriu um modelo de dois *loci* para a expressão do comportamento higiênico, por meio da genética Mendeliana simples. Assim, um *locus* estaria envolvido na desoperculação das células e outro na remoção das crias doentes, sendo ambos homozigotos recessivos. Para Moritz (1988), um modelo de três *loci* é mais adequado para a composição genética do CH e

ponderou que outros padrões de herança do comportamento higiênico em abelhas não podem ser excluídos. Estudos baseados em técnicas moleculares revelaram até sete *loci* que podem ser responsáveis pela expressão do CH (LAPIDGE; OLDROYD; SPIVAK, 2002; OXLEY; SPIVAK; OLDROYD, 2010). Assim, apesar de avanços importantes no conhecimento da composição genética do comportamento higiênico, o seu modo de expressão ainda é em grande parte desconhecido.

Harpur *et al.* (2014) afirmaram que o comportamento higiênico não compromete a imunidade individual das abelhas e também representa menor custo fisiológico para as operárias em comparação com o custo de manutenção de uma imunidade inata, demonstrando que a seleção de colônias, considerando o CH, é possível e vantajosa (EVANS; PETTIS, 2005; SCHMID-HEMPEL, 2005). As estimativas de herdabilidade entre 0,15 e 0,61 foram encontradas e consideradas adequadas para a formação de linhagens de colônias higiênicas (BOECKING; BIENEFELD; DRESCHER, 2000; COSTA-MAIA *et al.*, 2011; ESPINOSA-MONTAÑO, 2008; HARBO; HARRIS, 1999). Estudos indicam que colônias higiênicas são economicamente interessantes para apicultores por apresentarem maior produção de pólen e mel, do que colônias não selecionadas para essa característica (NICODEMO *et al.*, 2013; SPIVAK; REUTER, 1998b). Esses resultados são ainda mais animadores por aliar sanidade das colônias com incrementos na produção.

1.3.2 Fatores que influenciam o comportamento higiênico

O comportamento higiênico, apesar de ser uma característica de base genética, sofre influência dos fatores ambientais bem como das condições da colônia (BIGIO; SCHÜRCH; RATNIEKS, 2013), ocasionando diferenças no grau de higiene. Estes autores afirmaram que mesmo em colônias selecionadas, o comportamento higiênico é uma característica muito rara e representa apenas 10% do total, devido à influência desses fatores internos e externos às colônias. Outros autores acreditam que comportamento higiênico raramente é manifestado com elevado grau de higiene (PÉREZ-SATO *et al.*, 2009; WAITE;

BROWN; THOMPSON, 2003). Para Wilson-Rich *et al.* (2009) e Al Toufailia *et al.* (2018), a habilidade para o comportamento higiênico pode ser encontrada em todas as populações de abelhas, embora em níveis mais baixos em colônias não selecionadas.

Fatores ligados à atividade externa das abelhas também estão relacionados à expressão do comportamento higiênico. Estes fatores podem ser climáticos e referentes aos recursos tróficos disponíveis no ambiente.

O fluxo de néctar é indicado por estimular a taxa de remoção de cria morta ou doente (GUERRA JR.; GONÇALVES; DE JONG, 2000; SPIVAK; GILLIAM, 1993). Resultados diferentes foram encontrados por Bigio *et al.* (2013), sobre o efeito de fornecimento de alimento artificial (xarope à base de sacarose) e tamanho da colônia, sugerindo que o teste em colônias pode ser feito a qualquer momento, sem especial atenção às condições de néctar ou níveis de cria.

Outro fator externo importante foi estudado por Bigio *et al.* (2014), comparando os níveis de higiene de colônias com rainhas inseminadas instrumentalmente com machos também selecionados, e colônias com rainhas acasaladas naturalmente, encontrando níveis de higiene superiores nas colônias das rainhas e machos selecionados (99,8%) comparados às colônias naturalmente acasaladas (95,5%). Tal fato reforça a importância da seleção de rainhas para aumentar a frequência de machos também com potencial higiênico.

Para Arathi; Spivak (2001), o comportamento higiênico está relacionado a fatores internos como a percentagem de abelhas na colônia capazes de executá-lo, que se associam a processos moleculares distintos no cérebro (GEMPE *et al.*, 2016). Além disso, colônias mais fortes (populosas e com estoque de alimento) apresentam altos níveis de comportamento higiênico (STANIMIROVIC *et al.*, 2002), porque aumenta a probabilidade de ter mais abelhas com a capacidade de remoção das crias mortas.

A idade das operárias envolvidas no estudo de comportamento higiênico realizado por Pereira *et al.* (2013) mostra que as operárias de quatro a 12 dias de idade eram responsáveis pelo CH em favos mais novos, enquanto operárias de seis a 13 dias de idade em favos mais velhos. Para Arathi; Burns; Spivak

(2000), as abelhas com idade entre 10 e 20 dias são responsáveis pelo comportamento higiênico.

Pereira *et al.* (2013) encontraram diferenças importantes na duração das etapas do comportamento higiênico nos períodos diurno e noturno. Durante o dia, o tempo total desde a perfuração até a remoção das crias foi menor do que à noite, concluindo que a hora do dia também deve ser considerada na avaliação do comportamento de higiene em abelhas do gênero *Apis*. Esses autores afirmaram ainda que a remoção de crias mortas na idade de larva foi mais rápida do que para pupas.

Outro aspecto importante foi observado por Schöning *et al.* (2012), a simples presença do ácaro *Varroa destructor* na colônia não é estímulo para a remoção da cria, mas isso muda quando há danos provocados nas larvas e em função do potencial de infecção dos ácaros contaminado por vírus. Esses autores identificaram compostos voláteis emanados pelas crias parasitadas por ácaros infectados, que são claramente distintos daqueles não infectados. Zhao *et al.* (2015) também encontraram diferenças na quantidade e no tipo de compostos voláteis emanados de cria saudável e crias contaminadas pelo fungo *Ascosphaera apis*.

A maioria dos estudos de comportamento higiênico preocupa-se com o aumento da olfação das abelhas adultas, mas os sinais emitidos pelas crias também são importantes (WAGONER *et al.*, 2018). Esse aspecto relacionado com as crias indica que o melhoramento seletivo do comportamento higiênico das abelhas pode ser potencializado por meio de ensaios de campo contendo compostos relacionados à sinalização larval.

O relato de dois casos de comportamento higiênico é apresentado no Artigo 1 do corpo desta Tese, tratando de duas espécies de abelhas sem ferrão: *Melipona scutellaris* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

1.4 Ecologia química

As abelhas e demais insetos interagem com o ambiente e demais organismos do meio por meio de eficientes mecanismos de comunicação

desenvolvidos ao longo da evolução. Os estímulos utilizados na comunicação são de natureza física como sinais visuais, táteis e vibracionais, e possivelmente os mais importantes, sinais de natureza química, os semioquímicos. Esses compostos levam até o receptor do sinal, uma mensagem química, desencadeando reações comportamentais específicas (LAW; REGNIER, 1971). Como a comunicação ocorre entre indivíduos da mesma espécie (comunicação intraespecífica) ou com diferentes espécies (comunicação interespecífica), são utilizados diferentes compostos químicos divididos em duas categorias: feromônios e aleloquímicos (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009).

Os feromônios são substâncias que medeiam a comunicação entre organismos da mesma espécie (BUTENANDT; KARLSON, 1959). Eles podem ser classificados como desencadeadores, quando provocam resposta imediata de comportamento ao receptor do estímulo; ou como preparadores, quando induzem mudanças fisiológicas em um organismo, provocando uma resposta mais lenta (WILSON; BOSSERT, 1963). Dentro dessas classificações, ainda pode-se separar os feromônios de acordo com o tipo de comportamento que provocam, a exemplo do feromônio sexual, feromônio de alarme e feromônio de trilha (VILELA; DELLA-LÚCIA, 2001).

Nas relações interespecíficas, as substâncias que medeiam a comunicação são os aleloquímicos, divididos em grupos, com base na relação benefício/prejuízo, provocada pelo estímulo: alomônios, cairomônios e sinomônios. Brown Jr; Eisner; Whittaker (1970) descreveram alomônios como aleloquímicos que beneficiam o organismo que as emite e cairomônios, as substâncias que geram benefício ao organismo receptor do estímulo. O conceito de sinomônios foi proposto por Nordlund; Lewis (1976), como uma substância aleatória onde o receptor e o emissor se beneficiam.

O primeiro registro de comunicação por meio de sinais químicos em insetos foi descrito por Butenandt (1959), que identificou a estrutura química do Bombicol, o feromônio sexual do bicho da seda (*Bombyx mori* Lineu). Esse trabalho ampliou as possibilidades de pesquisa nos estudos do comportamento mediado por sinais químicos para insetos úteis bem como no controle da população de insetos indesejáveis nas culturas agrícolas.

Em abelhas sociais, o primeiro relato de comunicação mostrou que as abelhas executam diferentes danças para informar suas companheiras sobre a localização e qualidade de recursos (SCHMICKL; CRAILSHEIM, 2004; VON FRISCH, 1967). Mesmo durante a dança, são liberadas substâncias químicas específicas para garantir maior precisão na localização da fonte de alimento, indicando que as abelhas também se comunicam por meio de semioquímicos (DANNER *et al.*, 2016).

Outras pesquisas sobre a comunicação química das abelhas do gênero *Apis* foram realizadas e algumas substâncias já foram identificadas, como:

- Feromônio da rainha, uma mistura de compostos (ácido 9-oxo- (*E*)-2-decenoico, (*R*) e (*S*)-9-hidroxi- (*E*)-2-decenoico, *p*-hidroxibenzoato de metila, 4-hidroxi-3-metiloxifeniletanol, metilaoleato, álcool coniferílico, álcool palmítico e ácido linolênico) que atua como um feromônio liberador, atraindo operárias e como feromônio primário, inibindo fisiologicamente o desenvolvimento do ovário das abelhas operárias, além de ser atrativo sexual de zangões (SLESSOR; WINSTON; LE CONTE, 2005).

- Feromônios de alarme são produzidos na glândula mandibular e aparelho do ferrão de abelhas operárias, cuja substância principal é o acetato de isopentil (BREED; GUZMAN-NOVOA; HUNT, 2004; PANKIW, 2004a).

- Feromônio de agregação, produzido na glândula Nasonov de abelhas operárias produz um feromônio contendo uma mistura de nerol, geraniol, (*E*) - e (*Z*) -citrinal, ácido nerólico, ácido gerânico e (*E,E*) -farnesol. Este feromônio é usado para agregação durante a enxameação (SLESSOR; WINSTON; LE CONTE, 2005). As abelhas operárias adultas produzem uma substância, oleato de etila, que tem um efeito primário, atuando como inibidor químico utilizado para atrasar a idade no início do forrageamento (a presença de abelhas mais velhas causa um atraso no início do forrageamento de indivíduos mais jovens) (LEONCINI *et al.*, 2004).

- Feromônio das crias (composto por ésteres etílico e metílico dos ácidos palmítico, linoléico, linolênico, esteárico, oleico (LE CONTE; MOHAMMEDI; ROBINSON, 2001) e *E*- β -ocimeno (MAISONNASSE *et al.*, 2009), são importantes na comunicação entre ninhada e abelhas operárias. Esse feromônio

modula o comportamento alimentar das abelhas operárias, inibe a ativação do ovário das operárias, induz as abelhas operárias a cobrir as células da ninhada, aumenta a atividade das glândulas hipofaríngeas das abelhas enfermeiras e modula a maturação comportamental das abelhas operárias. McAfee *et al.* (2018) sugerem que o β -ocimeno sinaliza a atenção das operárias higiênicas, enquanto o ácido oleico é o sinal da morte, desencadeando a remoção.

Para abelhas sem ferrão, o principal foco no estudo de feromônios está relacionado aos feromônios de trilha, sendo o decanoato de hexil principal composto encontrado na glândula labial de *Trigona recursa* Smith (JARAU *et al.*, 2006), octanoato de octil encontrado em *Trigona spinipes* Fabricius (SCHORKOPF *et al.*, 2007) e butanoato de farnesil em *Geotrigona mombuca* Smith (STANGLER *et al.*, 2009).

1.4.1 Extração e identificação de compostos voláteis

A extração de compostos voláteis tem sido muito utilizada nas ciências agrárias, especialmente na entomologia, em virtude da necessidade de manejo de pragas que acometem culturas agrícolas (BERGMANN; GONZALES; ZARBIN, 2009) e da conservação de insetos úteis como as abelhas (AYASSE; JARAU, 2014). Muitas técnicas de extração quase sempre aliadas à cromatografia são utilizadas, destacando-se a extração em fase sólida ou em *headspace* dinâmico e extração por aeração, ambas eficientes, mas utilizadas em situações distintas (VALENTE, AUGUSTO, 2000; ZARBIN *et al.*, 1999)

A microextração em fase sólida (SPME), acrônimo das iniciais em língua inglesa de “Solid Phase Microextration”, é uma técnica miniaturizada de extração de analitos bastante utilizada para extração de compostos voláteis. Desde a invenção na década de 90, a sua aplicação tem sido intensificada em diversos campos de estudo (PAWLISZYN, 2000) principalmente por apresentar vantagens em relação aos outros métodos de extração de voláteis: não requer instrumentação analítica sofisticada, não utiliza solvente orgânico ou apenas uma pequena quantidade, rápido processo operacional, permite a reutilização

das fibras extratoras, e integra em um único sistema a extração, concentração e introdução da amostra no cromatógrafo (VAS; VEKEY, 2004).

A SPME consiste em suporte para fibra de sílica fundida revestida com um fino filme de um polímero ou de um sólido adsorvente (BIANCHIN *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015). Os voláteis são extraídos da amostra para o *headspace* (espaço confinante), em seguida com a fibra retraída na agulha, o septo do frasco de amostra é perfurado e a fibra é exposta à amostra. Terminado o tempo de extração, a fibra é novamente retraída, a agulha é retirada do septo e exposta para dessorção térmica, em seguida é retraída e retirada do injetor no cromatógrafo gasoso (PLUTOWASKA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2015).

A extração por aeração consiste no aprisionamento dos voláteis emitidos pelos insetos em materiais polímeros adsorventes (ZARBIN, 2001). Os sistemas de aeração utilizados são geralmente de vidro e são compostos por uma câmara com entrada e saída para o fluxo de ar, onde são colocadas as amostras, tubos de vidro contendo os polímeros adsorventes, e um sistema para produção de uma corrente de ar previamente filtrado cujo fluxo promove o arraste dos constituintes voláteis liberados pelos insetos presentes no interior da câmara. Após a coleta dos voláteis, utiliza-se um solvente com alto grau de pureza e alta volatilidade, tais como hexano, diclorometano e éter etílico (ZARBIN, 2001) para eluição e obtenção do extrato. Para a separação e a identificação dos compostos presentes no extrato, a técnica mais indicada é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

A cromatografia gasosa desenvolveu-se a partir da cromatografia líquida em meados da década de 1960. Essa técnica consiste em um método de separação de compostos voláteis (NASCIMENTO; SANTANA, 2001) através da qual pode-se obter informações sobre o perfil de compostos da amostra, suas concentrações relativas, seus pesos moleculares e graus de polaridade. A identificação dos compostos ocorre por comparação dos tempos de retenção e comparação com resultados descritos na literatura e pela espectrometria de massas, a qual consiste na ionização/fragmentação dos compostos que foram previamente separados pelo cromatógrafo (ZARBIN, 2001).

Considerando que a percepção dos insetos a esses compostos ocorre principalmente nas antenas, os estudos da morfologia olfativa e da eletrofisiologia tem grande relevância para conhecimento das estruturas antenais e relação dessas estruturas com a percepção olfativa. A técnica mais utilizada para os estudos da morfologia é a microscopia eletrônica, que permite alta resolução das estruturas presentes na superfície da antena. Já a Eletroantenografia permite identificar os compostos bioativos que são captados pelas estruturas da antena e estudar sua função no comportamento dos insetos.

1.4.2 *Morfologia olfativa*

As antenas são apêndices móveis, que no caso das abelhas é formado de três partes: escapo, pedicelo e flagelo subdividido em 10 segmentos para fêmeas e 11 para machos (CRUZ-LANDIM, 2009).

As antenas possuem estruturas chamadas sensilas que funcionam como receptores sensoriais (olfato, gustação, mecanorrecepção, termorrecepção e higrorrecepção) (HANSSON; STENSMYR, 2011). As sensilas podem ser encontradas em todo o corpo dos insetos, no entanto, são mais abundantes nas antenas, em sua face dorsal (CHAPMAN, 2013; CRUZ-LANDIM, 2009). No interior das sensilas, são secretadas em grande quantidade na linfa sensilar as proteínas ligadoras de odorantes (VOGT; RIDDIFORD, 1981), responsáveis pelo transporte de compostos voláteis até a membrana dos neurônios receptores, onde o sinal ambiental é transformado em sinal elétrico e resulta em resposta fisiológica e/ou comportamento dos insetos. As sensilas variam em quantidade e tipo a depender da espécie, castas, idade e hábito alimentar do inseto (CHEN, 2003).

As sensilas são classificadas de acordo com sua morfologia ou função, sendo encontrados na família Apidae até 13 tipos, classificados segundo Frasnelli *et al.* (2010) e Ravaiano *et al.* (2014) como: sensilas tricoides (I, II, III, IV, V, VI), sensila cética, placoide, celocônica, campaniforme, ampulácea, basicônica e setae. Para esse trabalho foi utilizada principalmente a descrição

adotada por Ravaiano *et al.* (2014) em função de também utilizar a *M. quadrifasciata anthidioides* como modelo de estudo:

- Sensilas tricoides são retas e com extremidade afilada e a base normalmente inserida em um soquete levemente elevado em relação à cutícula, mas podendo ter variações nessa inserção (NAKANISHI *et al.*, 2009). Pode-se encontrar características como sulcos longitudinais e em espiral chamadas de tricóide *grooved*, como visto por Das *et al.* (2011) e Fialho *et al.* (2014), ou também ser curvada em formato de foice chamada de sensila tricóide falciforme, segundo Frasnelli *et al.* (2010).

- Sensila basicônica, possui a aparência de pelo curto mais espesso e com a extremidade arredondada (FIALHO *et al.*, 2014; NAKANISHI *et al.*, 2009), se comparado às sensilas tricoides.

- Sensilas placoides, são placas cuticulares arredondadas ou ovaladas, situadas ao nível da cutícula e delimitadas por linhas em forma de sulco, com a superfície levemente deprimida em relação à cutícula, como em *A. mellifera* (FRASNELLI *et al.*, 2010).

- Sensilas campaniformes, são concavidades bem delimitadas na cutícula com uma forma de pequeno círculo central onde a cutícula apresenta pequena elevação nas bordas (FIALHO *et al.*, 2014; FRASNELLI *et al.*, 2010).

- Sensilas celocônicas e ampuláceas são morfologicamente semelhantes, ambas pequenas e com um orifício central, sendo o tamanho maior na celocônica (NAKANISHI *et al.*, 2009).

- Sensilas setae, são inclinadas para o ápice da antena, mas na parte ventral da sensila apresenta sulcos, sua base está inserida em uma depressão da cutícula (RAVAIANO *et al.* 2014).

As sensilas relacionadas ao estímulo químico são caracterizadas por inervação multineuronal e pela presença de poros em sua cutícula, podendo ser únicos (uniporos) ou vários (multiporos). As sensilas multiporos são responsáveis pela olfação e capazes de perceber odores mesmo em baixa concentração. As uniporos são responsáveis pela gustação ou quimiorrecepção por contato (RAVAIANO *et al.*, 2014). As sensilas relacionadas à quimiorrecepção são as sensilas tricoides e seus subtipos, placóide e basicônica,

destas, apenas a sensila basicônica tem função exclusiva de quimiorrecepção (RAVAIANO *et al.*, 2014). A sensila tricoide pode exercer função de quimio e mecanorrecepção, dependendo da presença ou ausência de poros e da quantidade de neurônio que a inerva (NAKANISHI *et al.*, 2009; RENTHAL *et al.*, 2003). A sensila placoide é apontada por Gramacho *et al.* (2003) como responsável pela captação de odor que incita o comportamento higiênico nas colônias.

1.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi proposto por Knoll (1935), mas a ideia inicial passou por diversas melhorias para garantir melhor desempenho e qualidade de resolução, sendo comercializado somente em 1965 pela Cambridge Scientific Instrument – modelo *Stereoscan*. Desde então, tornou-se indispensável em muitos tipos de pesquisa devido ao seu poder de resolução, na ordem de 2 a 5 nm, alguns instrumentos mais modernos com até 1 nm, já no microscópio ótico a resolução máxima é de 0,5 μm (NAGATANI *et al.*, 1987).

O MEV é composto pelo canhão de elétrons e lentes eletrônicas; sistema de vácuo, necessário para evitar a interação do feixe de elétrons com moléculas como água e oxigênio; câmara de amostra e um sistema de detectores. A imagem é formada através de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro que é usado para varrer o espécime, o qual emite os chamados elétrons secundários (interação de um feixe primário com a superfície de interesse) (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Para obtenção dessas imagens, faz-se necessário o tratamento e preparação de amostras, principalmente amostras biológicas. Primeiramente é realizada a fixação através de métodos físicos ou químicos, procedimento necessário para estabilizar as estruturas celulares e intercelulares. As soluções fixadoras utilizadas no método químico podem alterar o pH da amostra, sendo necessário o tamponamento dessas soluções a fim de neutralizar ou retardar a acidificação diminuindo assim o dano sobre a amostra processada. Inicia-se em seguida a desidratação com banhos sucessivos de concentrações crescentes de agentes desidratantes como o etanol e a acetona. Após o preparo, a amostra precisa ser montada no suporte porta-amostras (*stub*)

e metalizada para aumentar a condutividade da superfície através de uma fina camada (com até 20-30 nm de espessura) de metal, de preferência, ouro e então disposta na câmara de amostras do MEV para obtenção das imagens.

1.4.4 Eletroantenografia (EAG)

Schneider (1957) estudou o sistema olfativo de *B. mori* e observou variação de voltagem entre as extremidades da antena quando exposta ao seu feromônio. O potencial elétrico observado poderia ser registrado utilizando-se uma antena isolada, imersa em solução de NaCl a 1% e posicionada entre dois microeletrodos capilares de prata, conectados a um amplificador e a um registrador, assumindo que a variação medida é causada por despolarizações elétricas de muitos neurônios olfativos na antena de insetos (STRUBLE; HEINRICH, 1984).

A amplitude da resposta eletroantenográfica aumenta com o aumento das concentrações até atingir um nível de saturação, mas também depende da natureza do estímulo, das espécies e sexo do inseto (MORAES *et al.*, 2008).

As informações químicas e elétricas das sensilas olfativas são interpretadas em eletroantenogramas (KAISLING; THORSON, 1980), no entanto apenas o registro da despolarização não especifica quais componentes estão afetando o comportamento biológico do inseto, sendo necessária a associação do eletroanténografo ao cromatógrafo gasoso (CG-EAG).

A amostra, após ser injetada e vaporizada, percorre toda a coluna cromatográfica, onde é efetuada a separação dos compostos. Ao final da corrida, o fluxo (eluente) ao sair da coluna é dividido em dois, sendo que uma parte vai para o Detector de Ionização de Chamas (FID) e, conseqüentemente, o cromatograma é traçado, e a outra parte vai para o EAG, onde a resposta da antena é amplificada. Assim, são obtidas duas detecções simultâneas, sendo possível saber se o composto registrado é biologicamente ativo ou não.

Referências

- AIDAR, D. S. **A mandaçaia**: biologia e manejo de abelhas com ênfase à *Melipona quadrifasciata* Lep. FUNPEC, Ribeirão Preto, 161 p., 2010.
- ALVES, R. M.; CARVALHO, C. A.; SOUZA, B. A.; SANTOS, W. S. Areas of natural occurrence of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) in the state of Bahia, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n.3, p. 679-88, 2012. DOI: 10.1590/s0001-37652012000300010
- ALVES, R. M. O.; SANTOS, D. R.; NASCIMENTO, A. S.; SODRÉ, G. S.; CARVALHO, C. A. L. Correlation between production and biometric parameters in colonies of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Scientific Electronic Archives**, v. 12, n. 1, p. 91–97, 2019. DOI: <https://doi.org/10.36560/1212019781>
- AL TOUFAILIA, H.; ALVES, D. A.; BENTO, J. M.; MARCHINI, L. C.; RATNIEKS, F. L. Hygienic behaviour in Brazilian stingless bees. **Biology Open**, v. 5, n. 11, p. 1712-1718, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1242/bio.018549>
- AL TOUFAILIA, H.; EVISON, S. E.; HUGHES, W. O.; RATNIEKS, F. L. Both hygienic and non-hygienic honeybee, *Apis mellifera*, colonies remove dead and diseased larvae from open brood cells. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1751, p. 20170201, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0201>
- ARATHI, H. S.; BURNS, I.; SPIVAK, M. Ethology of hygienic behaviour in the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): behavioural repertoire of hygienic bees. **Ethology**, v. 106, n. 4, p. 365-379, 2000.
- ARATHI, H. S.; SPIVAK, M. Influence of colony genotypic composition on the performance of hygienic behaviour in the honeybee, *Apis mellifera* L. **Animal Behaviour**, v. 62, n. 1, p. 57-66, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1731>
- AYASSE, M.; JARAU, S. Chemical ecology of bumble bees. **Annual Review of Entomology**, v. 59, p. 299-319, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-161949>
- BATALHA-FILHO, H.; MELO G. A. R.; WALDSCHMIDT, A. M.; CAMPOS, L. A. O.; FERNANDES-SALOMÃO, T. M. Geographic distribution and spatial differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). **Zoologia**, v. 26, n. 2, p. 213-219, 2009.
- BERGMANN, J.; GONZALES, A.; ZARBIN, P. H. G. Insect Pheromone Research in South America. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1206-1219, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000700003>
- BIANCHIN, J. N.; NARDINI, G.; MERIB, J.; DIAS, A. N.; MARTENDAL, E.; E CARASEK, E. Screening of volatile compounds in honey using a new sampling strategy combining multiple extraction temperatures in a single assay by HS-SPME–GC–MS. **Food Chemistry**, v. 145, p. 1061-1065, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.139>
- BIGIO, G.; AL TOUFAILIA, H.; HUGHES, W. O.; RATNIEKS, F. L. The effect of one generation of controlled mating on the expression of hygienic behavior in honey bees. **Journal of**

Apicultural Research, v. 53, n. 5, p.563-568, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.5.07>

BIGIO, G.; SCHÜRCH, R.; RATNIEKS, F. L. W. Hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera: Apidae): effects of brood, food, and time of the year. **Journal of economic entomology**, v. 106, n. 6, p. 2280-2285, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1603/EC13076>

BOECKING, O.; BIENEFELD, K.; DRESCHER, W. Heritability of the varroa-specific hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 117, n. 6, p. 417-424, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0388.2000.00271.x>

BOECKING, O.; DRESCHER, W. The removal response of *Apis mellifera* L. colonies to brood in wax and plastic cells after artificial and natural infestation with *Varroa jacobsoni* Oud. and to freeze-killed brood. **Experimental and Applied Acarology**, v. 16, n. 4, p. 321-329, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01218574>

BOECKING, O.; SPIVAK, M. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. **Apidologie**, v. 30, n. 2-3, p. 141-158, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:19990205>

BREED, M. D.; GUZMAN-NOVOA, E.; HUNT, G. J. Defensive behavior of honey bees: Organization, genetics, and comparisons with other bees. **Annual Review of Entomology**, v. 49, p. 271-298, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123155>

BRITO, B. B. P.; FAQUINELLO, P.; PAULA-LEITE, M. C. de; CARVALHO, C. A. L. de. Parâmetros biométricos e produtivos de colônias em gerações de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, p. 265-273, 2013.

BROWN JR, W. L.; EISNER, T.; WHITTAKER, R. H. Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers. **Bioscience**, v. 20, n. 1, p. 21-21, 1970.

BÜCHLER, R.; ANDONOV, S.; BIENEFELD, K.; COSTA, C.; HATJINA, F.; KEZIC, N.; WILDE, J. Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens. In V. Dietemann, J. D. Ellis, & P. Neumann (Eds.), *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: Standard methods for *Apis mellifera* research*. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 1, p. 1-29, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.07>

BUTENANDT, A.; BECKMANN, R.; STAMM, D.; HECKER., E. Über den Sexual-Lockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitution. **Naturforsch**, v.14, p. 283, 1959.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version**. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em: Jan/09/2022

CHAMBÓ, E.D. **Beekeeping and bee conservation: advances in research**. InTech, Rijeka, Croatia. 242 p., 2016.

CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. 5th ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press, p. 929, 2013.

CHEN, H. H.; ZHAO, Y. X.; KANG, L. Antennal sensilla of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) in relation to food preferences and habits. **Journal of Biosciences**, v. 28, p. 743-752, 2003. <https://doi.org/10.1007/BF02708435>

COSTA-MAIA, F. M.; TOLEDO, V. A. A.; MARTINS, E. N.; LINO-LOURENÇO, D. A.; SEREIA, M. J.; OLIVEIRA, C. A. L.; FAQUINELLO, P.; HALAK, A. L. Estimates of covariance components for hygienic behaviour in Africanized honeybees (*Apis mellifera*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 9, p. 1909-1916, 2011.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. Editora UNESP, São Paulo, 2009.

DANNER N.; MOLITOR A. M.; SCHIELE S.; HÄRTEL S.; STEFFAN-DEWENTER, I. Season and landscape composition affect pollen foraging distances and habitat use of honey bees. **Ecological Applications**, v. 26, n. 6, p.1920-1929, 2016. <https://doi.org/10.1890/15-1840.1>

DAS, P.; CHEM, L.; SHARMA, K. R.; FADAMIRO, H. Y. Abundance of antennal chemosensilla in two parasitoid wasps with different degree of host specificity may explain sexual and species differences in their response to host-related volatiles. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, n. 10, p. 900-909, 2011. <https://doi.org/10.1002/jemt.20974>

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. EdIPUCRS, 2007.

DÍAZ, S.; SOUZA URBANO, S.; CAESAR, L.; BLOCHTEIN, B.; SATTLER, A.; ZUGE, V.; HAAG, K. L. Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 143, p. 35-39, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.11.012>

ESPINOSA-MONTAÑO, L. G.; GUZMÁN-NOVOA, E.; SÁNCHEZ-ALBARRÁN, A.; MONTALDO, H.; CORREA-BENÍTEZ, A. Estudio comparativo de tres pruebas para evaluar el comportamiento higiénico en colônias de abejas (*Apis mellifera* L.). **Veterinária México**, v. 39, n. 1, p. 39-54, 2008.

EVANS, J. D.; PETTIS, J. S. Colony-level impacts of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera*. **Evolution**, v. 59, n.10, p. 2270-2274, 2005.

EVANS, J. D.; SPIVAK, M. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 1, p. 62-72, 2010.

FACCHINI, E.; BIJMA, P.; PAGNACCO, G.; RIZZI, R.; BRASCAMP, E. W. Hygienic behaviour in honeybees: a comparison of two recording methods and estimation of genetic parameters. **Apidologie**, v. 50, n.2, p. 163-172, 2019. DOI: 10.1007/s13592-018-0627-6

FIALHO, M. C. Q.; GUSS-MATIELLO, C. P.; ZANUNCIO, J. C. CAMPOS, L. A. O. SERRÃO, J. E. A comparative study of the antennal sensilla in corbiculate bees. **Journal of Apicultural Research**. v. 53, n. 3, p. 392-403, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.53.3.07>

FRASNELLI, E.; ANFORA, G.; TRONA, F.; TESSAROLO, F.; VALLORTIGARA, G. Morpho-functional asymmetry of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 2, p. 221-225, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.046>

FÜRST, M. A.; MCMAHON, D. P.; OSBORNE, J. L.; PAXTON, R. J.; BROWN, M. J. F. Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. **Nature**, v. 506, n. 7488, p. 364, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12977>

GEMPE, T.; STACH, S.; BIENEFELD, K.; OTTE, M.; BEYE, M. Behavioral and molecular studies of quantitative differences in hygienic behavior in honeybees. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, p. 474, 2016. DOI: [10.1186/s13104-016-2269-y](https://doi.org/10.1186/s13104-016-2269-y)

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 849-857, 2015.

GILLIAM, M.; TABER, S.; RICHARDSON, G.V. Hygienic behavior of bees in relation to chalk disease disease. **Apidologie**, v. 14, n. 1, p. 29-39, 1983.

GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Estudo Comparativo dos Métodos de Congelamento e Perfuração de Crias para Avaliação do Comportamento Higiénico em Abelhas Africanizadas. In: Anais do IV Congresso Ibero-latinoamericano de Apicultura, Rio Cuarto-Córdoba, p. 45, 1994.

GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Sequential hygienic behavior in Carniolan honey bees (*Apis mellifera carnica*). Bioassays for hygienic behavior **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 655–663, 2009b.

GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S.; ROSENKRANZ, P.; DE JONG, D. Influence of body fluid from pin-killed honey bee pupae on hygienic behavior. **Apidologie**, v. 30, n.5, p. 367-374, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:19990502>

GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S.; STORT, A. C.; NORONHA, A. B. Is the number of antennal plate organs (sensilla placodea) greater in hygienic than in nonhygienic Africanized honey bees?. **Genetics and Molecular Research**. v. 2, n. 3, p. 309-316, 2003.

GRAMACHO, K.; GONÇALVES, L. S. Comparative study of the hygienic behavior of Carniolan and Africanized honey bees directed towards grouped versus isolated dead brood cells. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 744-750, 2009a. DOI: <https://doi.org/10.4238/vol8-2kerr041>

GRECO, M. K.; HOFFMANN, D.; DOLLIN, A.; DUNCAN, M.; SPOONERHART, R.; NEUMANN, P. The alternative Pharaoh approach: stingless bees mummify beetle parasites alive. **Naturwissenschaften**, v. 97, n. 3, p. 319-323, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00114-009-0631-9>

GUERRA JR.; J. C. V.; GONÇALVES, L. S.; DE JONG, D. Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) are more efficient at removing worker brood artificially infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans than are Italian bees or Italian/Africanized hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 89-92, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572000000100016>

HANSSON, B. S.; STENSMYR, M. C. Evolution of insect olfaction. **Neuron**. V. 72, p. 698-711, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.003>

HARBO, J. R.; HARRIS, J. W. Heritability in honey bees (Hymenoptera: Apidae) of characteristics associated with resistance to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 2, p. 261-265, 1999.

HARPUR, B. A.; CHERNYSHOVA, A.; SOLTANI, A.; TSVETKOV, N.; MAHJOORIGHASRODASHTI, M.; XU, Z.; ZAYED, A. No genetic tradeoffs between hygienic behaviour and individual innate immunity in the honey bee, *Apis mellifera*. **PLoS ONE**, v. 9, n.8, p. 104-214, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104214>

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoesdiversas/dcom_sumario_executivo_livro_vermelho_da_fauna_brasileira_ameacada_de_extincao_2016.pdf. Acesso em: 28 Novembro, 2018.

JARAU S.; VAN VEEN, J. W.; AGUILAR, I.; AYASSE, M. A scientific note on virgin queen acceptance in stingless bees: evidence for the importance of queen aggression. **Apidologie**, v. 41, n. 1, p. 38-39, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido/2009045>

JARAU, S.; SCHULZ, C. M.; HRNCIR, M.; FRANCKE, W.; ZUCCHI, R., BARTH, F. G.; AYASSE, M. Hexyl decanoate, the first trail pheromone compound identified in a stingless bee *Trigona recursa*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 7, p. 1555-1564, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9069-0>

JESUS, J. N.; CHAMBÓ, E. D.; DA SILVA SODRÉ, G.; DE OLIVEIRA, N. T. E.; DE CARVALHO, C. A. L. Hygienic behavior in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini). **Apidologie**, v. 48, n. 4, p.504-512, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0495-5>

JONES, G. R.; OLDHAM, N. J. Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 843, n. 1-2, p. 199-236, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00446-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00446-X)

KAISLING, K.E.; THORSON, J. **Insect olfactory sensilla: structural, chemical and electrical aspects of the functional organization**. In: SATTELLE, D.B.; HALL, L.M.; HILDEBRANDT, J.G. (Ed.). Receptors for neurotransmitters, hormones and pheromones in insects. New York: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p. 261-282, 1980.

KÄRCHER, M. H.; MENEZES, C.; ALVES, D. A.; BEVERIDGE, O. S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; RATNIEKS, F. L. Factors influencing survival duration and choice of virgin queens in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **Naturwissenschaften**, v. 100, n. 6, p. 571-580, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00114-013-1053-2>

KARLSON, P.; BUTENANDT, A. Pheromones (ectohormones) in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 4, n. 1, p. 39-58, 1959.

KERR, W. E. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*, **Genetics**, v. 35, n. 2, p. 143, 1950.

KNOLL, M. Aufladepotential und sekundäremission elektronenbestrahlter körper. **Zeitschrift für technische Physik**, v. 16, p. 467-475, 1935.

LANDIM, C. C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. Editora UNESP, São Paulo, 2009.

LAPIDGE, K. L.; OLDROYD B. P.; SPIVAK, M. Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 12, p. 565-568, 2002.

LAW, J. H.; REGNIER, F. E. Pheromones. **Annual review of biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 533-548, 1971.

LE CONTE, Y.; MOHAMMEDI, A.; ROBINSON, G. E. Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 268, p. 163–168, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0407652101>

LECLERCQ, G.; FRANCIS, F.; GENGLER, N.; BLACQUIÈRE, T. Bioassays to quantify hygienic behavior in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies: a review. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 5, p. 663-673, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1494916>

LEONCINI, I.; LE CONTE, Y.; COSTAGLIOLA, G.; PLETTNER, E.; TOTH, A. L.; WANG, M. W.; HUANG, Z.; BECARD, J. M.; CRAUSER, D.; SLESSOR, K. N.; ROBINSON, G. E. Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 101, p. 17559-17564, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0407652101>

LEONHARDT, S. Chemical Ecology of Stingless Bees. **Journal of Chemical Ecology**, v. 43, n. 4, p. 385-402, 2017. DOI: [10.1007/s10886-017-0837-9](https://doi.org/10.1007/s10886-017-0837-9).

LINDAUER, M.; KERR, W. E.; Communication between the workers of stingless bees. **Bee World**, v. 41, n. 2, p. 29-41, 1960.

MAISONNASSE, A.; LENOIR, J. C.; COSTAGLIOLA, G.; BESLAY, D.; CHOTEAU, F.; CRAUSER, D.; BECARD, J. M.; PLETTNER, E.; LE CONTE, Y. A scientific note on E- β -ocimene, a new volatile primer pheromone that inhibits worker ovary development in honey bees. **Apidologie**, v. 40, n. 5, p. 562–564, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido/2009024>

MCAFEE, A.; CHAPMAN, A.; IOVINELLA, I.; GALLAGHER-KURTZKE, Y.; COLLINS, T. F.; HIGO, H.; FOSTER, L. J. A death pheromone, oleic acid, triggers hygienic behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5719, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24054-2>

MICHENER, C.D. **The Bees of the World**. Ed. Johns Hopkins, Baltimore. 953 p., 2007.

MORAES, M.; LAUMANN, R.; PAULA, D.; PAREJA, M.; SILVA, C.; VIEIRA, H. G.; BORGES, M. **Eletróantografia: a antena do inseto como um biossensor**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 2008.

MORITZ, R. F. A. A reevaluation of the two-locus model for hygienic behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Heredity**, v. 79, n.4, p. 257-262, 1988.

MOURE, J. S.; KERR, W. E. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera - Apoidea). **Dusenía**, v. 1, n. 2, p. 105-129, 1950.

NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system.

Scanning Microscopy. v.11, p. 901-909, 1987.

NAKANISHI, A.; NISHINO, H.; WATANABE, H.; YOKOHARI, F.; NISHIKAWA, M. Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and distribution of sensilla on the flagellum. **Cell and Tissue Research**. v. 338, p. 79-97, 2009.

NASCIMENTO, R. R.; SANT'ANA, A. E. G. **Isolamento e identificação dos semioquímicos de insetos sociais**. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed). Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação. Ribeirão Preto: Holos, p. 65-71, 2001.

NEWTON, D. C.; CANTEWELL, G. C.; BOURQUIN, E. P. Removal of freeze-killed brood as an index of nest cleaning behavior in honeybee colonies (*Apis mellifera* L.). **American Bee Journal**, v. 115, n. 1, p. 388-406, 1975.

NEWTON, D.; OSTASIEWSKI, N. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). **American Bee Journal**, v. 126, n. 4, p. 278-281, 1986.

NICODEMO, D.; DE JONG, D.; COUTO, R. H.; MALHEIROS, E. B. Honey bee lines selected for high propolis production also have superior hygienic behavior and increased honey and pollen stores. **Genetics and Molecular Research**, v.12, n. 1, p. 6931-6938, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2013.December.19.12>

NOGUEIRA-NETO P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão**, Nogueirapis, São Paulo, 1997.

NORDLUND D. A. e LEWIS W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal of Chemical Ecology**. v. 2, n. 2, p. 211-220, 1976.

NUNES, L. A.; ARAUJO, E. D.; CARVALHO, C. A. L.; WALDSCHMIDT, A. M. Population Divergence of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) Endemic to the Semi-arid Region of the State of Bahia, Brazil. **Sociobiology**, v. 52, n. 1, p. 81-93, 2008.

OLIVEIRA, K. N.; PAULA-LEITE, M. C.; FAQUINELLO, P.; CARVALHO, C. A. L.; LOURENCO, D. A. L.; SAMPAIO, R. B.; SANTOS, E. B. Parâmetros genéticos para características produtivas e biométricas em abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 67, n. 3, p. 819-826, 2015.

OLIVEIRA, M. P.; BRITO, B. B. P.; ALVES, E. M.; FAQUINELLO, P.; ALVES, R. M. O.; SODRÉ, G. S.; CARVALHO, C. A. L. Substratos vegetais utilizados para nidificação pelas abelhas *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Scaptotrigona* sp. em área restrita do Bioma Caatinga. **Magistra**, v. 24, n. 1, p.186-193, 2012.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, n. 3, p. 321-326, 2011.

OXLEY, P. R.; SPIVAK, M.; OLDROYD, B. P. Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). **Molecular Ecology**, v. 19, n. 7, p. 1452-61, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04569.x>

PANASIUK, B.; SKOWRONEK, W.; BIENKOWSKA, M. Influence of genotype and method of brood killing on brood removal rate in honey bee. **Journal of Apicultural Science**, v. 52, n. 2, p. 55-65, 2008.

PANKIW, T. Cued in: honey bee pheromones as information flow and collective decision-making. **Apidologie**, v. 35, n. 2, p. 217-226, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2004009>

PAWLISZYN, J. Theory of Solid-Phase Microextraction. **Journal of Chromatography A**, v.38, p. 270- 278, 2000.

PEDRO, S. R. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348-354, 2014.

PEREIRA, R. A.; MORAIS, M. M.; FRANCOY, T. M.; GONÇALVES, L. S. Hygienic behavior of africanized honey bees *Apis mellifera* directed towards brood in old and new combs during diurnal and nocturnal periods. **Insects**, v. 4, n. 4, p. 521-532, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects4040521>

PÉREZ-SATO, J. A.; CHÂLINE, N.; MARTIN, S. J.; HUGHES, W. O. H.; RATNIEKS, F. L. Multi-level selection for hygienic behaviour in honeybees. **Heredity**, v. 102, n. 6, p. 609-615, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.20>

PIRES, S.; JOSA, A.; MARTINS, A.; COSTA, A. Estudo de alguns métodos usados para avaliar o comportamento higiênico de ecotipos locais de abelhas Portuguesas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.101, n. :557-558, p. 45-49, 2006.

PLUTOWASKA, B.; CHMIEL, T.; DYMERSKI, T.; WARDENCKI, W. A headspace solid-phase microextraction method development and its application in the determination of volatiles in honeys by gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1288-1298, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.079>

POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H. T.; AIZEN, M. A.; BIESMEIJER, J. C.; BREEZE, T. D.; VANBERGEN, A. J. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v. 540, n. 7632, p. 220, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature20588>

RAFFERTY, N. E. Effects of global change on insect pollinators: multiple drivers lead to novel communities. **Current opinion in insect science**, v. 23, p. 22-27, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.06.009>

RAVAIANO, S. V.; FERREIRA, R. D.; CAMPOS, L. A.; MARTINS, G. F. The antennal sensilla of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a study of different sexes and castes. **Naturwissenschaften**, v. 101, n. 8, p. 603-611, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-014-1184-0>

RENTHAL, R.; VELASQUEZ, D.; OLMOS, D.; HAMPTON, J.; WERGIN, W. P. Structure and distribution of antennal sensilla of the red imported fire ant. **Micron**. 34:405-412, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(03\)00050-7](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(03)00050-7)

ROTHENBUHLER, W. C. Behavior genetics of nest cleaning behavior in honeybees. I. Response of four inbred lines to disease killed brood. **Animal Behaviour**, v. 12, n. 4, p. 578-583, 1964.

ROUBIK, D. W.; HEARD, T. A.; KWAPONG, P. STINGLESS BEE COLONIES AND POLLINATION. IN: ROUBIK D. W. (ed.). **The pollination of cultivated plants a compendium for practitioners. The pollination of cultivated plants: A compendium for practitioners.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy, 2018.

SARTO, M.; OLIVEIRA, E.; GUEDES, R.; CAMPOS, L. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 45, n. 5, p. 626-636, 2014.

SCHMICKL T, CRAILSHEIM K. Costs of environmental fluctuations and benefits of dynamic decentralized foraging decisions in honey bees. **Adaptive Behavior**, v. 12, n. 3-4, p. 263-277, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1177/105971230401200311>

SCHMID-HEMPEL, P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. **Annual Review of Entomology**, v. 50, n. 1, p. 529-551, 2005.

SCHNEIDER, Dietrich. Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo-und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. **Zeitschrift für Vergleichende Physiologie**, v. 40, n. 1, p. 8-41, 1957.

SCHÖNING, C.; GISDER, S.; GEISELHARDT, S.; KRETSCHMANN, I.; BIENEFELD, K.; HILKER, M.; GENERSCH, E. Evidence for damage-dependent hygienic behaviour towards *Varroa destructor*-parasitised brood in the western honey bee, *Apis mellifera*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 2, p. 264–271, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.062562>

SCHORKOPF, D. L. P.; HRNCIR, M.; MATEUS, S.; ZUCCHI, R.; SCHMIDT, V. M.; BARTH, F. G. Mandibular gland secretions of meliponine worker bees: further evidence for their role in interspecific and intraspecific defence and aggression and against their role in food source signalling. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 8, p. 1153- 1162, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.021113>

SCHORKOPF, D. L. P.; JARAU, S.; FRANCKE, W.; TWELE, R.; ZUCCHI, R.; HRNCIR, M.; SCHMIDT, V. M.; AYASSE, M.; BARTH, F. G. Spitting out information: *Trigona* bees deposit saliva to signal resource locations. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 274, p.895-898, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3766>

SCHWARZ, H. **Stingless Bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere**. Bulletin of the American Museum of Natural History, New York, Estados Unidos, 167 p., 1948.

SILVA, G. C.; DA SILVA, A. A. S.; SILVA, L. S. N.; GODOY, R. L. O.; NOGUEIRA, L. C.; QUITÉRIO, S. L.; RAICES, S. L. Method development by GC–ECD and HS-SPME–GC–MS for beer volatile analysis. **Food Chemistry**, v. 167, p. 71-77, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.033>

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. Fundação Araucária, Belo Horizonte, 253 p., 2002.

SLESSOR, K. N.; WINSTON, M. L.; LE CONTE, Y. Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, p. 2731-2745, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-005-7623-9>

- SPIVAK, M.; DOWNEY, D. L. Field assays for hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 1, p. 64-70, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/91.1.64>
- SPIVAK, M.; GILLIAM, M. Facultative expression of hygienic behavior of honey bees in relation to disease resistance. **Journal of Apicultural Research**, v. 32, n. 3-4, p. 147-157, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.1993.11101300>
- SPIVAK, M.; MASTERMAN, R.; ROSS, R.; MESCE, K. A. Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. **Journal of Neurobiology**, v. 55, n.3, p. 341-354, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1002/neu.10219>
- SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Honey bee hygienic behavior. **American Bee Journal**, v. 138, n. 4, p. 283-286, 1998a.
- SPIVAK, M.; REUTER, G. S. New direction for the Minnesota hygienic line of bees. **American Bee Journal**, v. 148, n. 1, p. 1085-1086, 2008.
- SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. **Apidologie**, v. 29, n. 1, p. 291-302, 1998b.
- SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. **Apidologie**, v. 32, p. 555-565, 2001.
- STANGLER, E. S.; JARAU, S.; HRNCIR, M.; ZUCCHI, R.; AYASSE, M. Identification of trail pheromone compounds from the labial glands of the stingless bee *Geotrigona mombuca*. **Chemoecology**, v.19, p.13-19, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00049-009-0003-0>
- STANIMIROVIC, Z.; PEJOVIC, D.; STEVANOVIC, J. Hygienic behavior in disease resistance of two honeybee ecogeographic varieties (*Apis mellifera carnica*) from Serbia. **Apiacta**, v. 37, n. 1, p. 24-131, 2002.
- STANIMIROVIC, Z.; STEVANOVIC, J.; MIRILOVIC, M.; STOJIC, V. Heritability of hygienic behavior in grey honey bees (*Apis mellifera carnica*). **Acta veterinaria**, v. 58, n. 5-6, p. 593-601, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2298/AVB0806593S>
- STRUBLE, D. L.; HEINRICH, A. Combined gas chromatography and electroantennogram recording of insect olfactory responses. In: H. E. Hummel and T. A. Miller (Eds). *Techniques in Pheromone Research*. Springer, New York, NY, p. 161-178, 1984.
- TABER, S. I. I. Bee behavior: determining resistance to brood diseases [American foulbrood, genetic aspects]. **American Bee Journal**, 1982.
- TEIXEIRA, K. O.; SILVEIRA, T. C. L.; HARTE-MARQUES, B. Different Responses in Geographic Range Shifts and Increase of Niche Overlap in Future Climate Scenario of the Subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier. **Sociobiology**, v. 65, n. 4, p. 630-639, 2018. DOI: <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v65i4.3375>
- THOMPSON, V. C. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. III. Effect of age of bees of a resistant line on their response to disease-killed brood. **Journal of Apicultural Research**, v. 3, n. 1, p. 25-30, 1964.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, p. 523-530, 2000.

VAN OYSTAEYEN, A.; OLIVEIRA, R. C.; HOLMAN, L.; VAN ZWEDEN, J. S.; ROMERO, C.; OI, C. A.; MILLAR, J. G. Conserved class of queen pheromones stops social insect workers from reproducing. **Science**, v. 343, n. 6168, p. 287-290, 2014.

VAS, G.; VEKEY, K. Solid-phase microextraction: A powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 33, n. 3, p. 233-254, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1002/jms.606>

VEIGA, J. C.; MENEZES, C.; CONTRERA, F. A. L. Insights into the role of age and social interactions on the sexual attractiveness of queens in an eusocial bee, *Melipona flavolineata* (Apidae, Meliponini). **The Science of Nature**, v. 104, n. 3-4, p. 31, 2017. DOI: 10.1007/s00114-017-1450-z

VELTHUIS, H. H. W.; VRIES, H.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The polygyny of *Melipona bicolor*: scramble competition among queens. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 222-239, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2006025>

VELTHUIS, H. H.; ROELING, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Repartition of reproduction among queens in the polygynous stingless bee *Melipona bicolor*. **Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology-Netherlands Entomological Society**, v. 12, p. 45-50, 2001.

VENTURIERI, G. C.; ALVES, D. A.; VILLAS-BÔAS, J. K.; CARVALHO, C. A. L.; MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; CONTRERA, F. A. L.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; NOGUEIRA-NETO, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola. In: Vera Lúcia Imperatriz-Fonseca; Dora Ann Lange Canhos; Denise de Araujo Alves; Antonio Mauro Saraiva. (Org.). **Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. 1ed.São Paulo-SP: EDUSP, p. 349-360, 2012.

VILELA, E.; DELLA-LÚCIA, T. M. C. (Org.). Feromônios de Insetos - biologia, química e emprego no manejo de pragas. 2ªed.Ribeirão Preto-SP: Hollos, 2001.

VOGT, R. G.; RIDDIFORD, L. M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. **Nature**, v. 293, n. 5828, p. 161 - 163, 1981.

von FRISCH, K. **The Dance Language and Orientation of Bees**. Cambridge: Harvard University Press,1967.

WAGONER, K. M.; SPIVAK, M.; RUEPPELL, O. Brood affects hygienic behavior in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 6, p.2520-2530, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/toy266>

WAITE, R.; BROWN, M.; THOMPSON, H. Hygienic behaviour in honey bees in the UK: a preliminary study. **Bee World**, 84: 19-26, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1080/0005772X.2003.11099567>

WILSON, E. O.; BOSSERT, W. H. Chemical communication among animals. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 19, p. 673-716, 1963.

WILSON-RICH, N.; SPIVAK, M.; FEFFERMAN, N. H.; STARKS, P. T. Genetic, Individual and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. **Annual Review of Entomology**, v. 54, n. 1, p. 405-423, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093301>

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, J. T. B.; LEAL, W. S. General methodologies employed on the isolation and structural identification of insects pheromones. **Química nova**, v. 22, n. 2, p. 263, 1999.

ZARBIN, P. H. G. **Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos**, p. 45-50. In: Vilela, E.F. e Della Lucia, T.M.C. (Eds) Feromônios de Insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas (2nd.Ed.). Holos Editora, Ribeirão Preto-SP. 2001.

ZARBIN, P. H.; RODRIGUES, M. A.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, p. 722-731, 2009.

ZHAO, H.; LIANG, Q.; LEE, J.; ZHANG, X.; HUANG, W.; CHENG, H.; LUO, Y. Behavioral Responses of *Apis mellifera*. Adult Workers to Odors from Healthy Brood and Diseased Brood. **Sociobiology**, v. 62, n. 4, p. 564-570, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v62i4.392>

ARTIGO I

COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM ABELHAS SEM FERRÃO¹

¹Artigo ajustado e publicado na forma de Capítulo de Livro na Editora da UFRB: JESUS, J. N. de; SAMPAIO, R. B.; SILVA, M.S.; SODRÉ, G. da S.; AGUIAR, C. M. L.; CARVALHO, C. A. L. de. Comportamento higiênico em abelhas sem ferrão. In: Adriana Regina Bagaldo; Ossival Lolato Ribeiro; Wendell Marcelo de Souza Perinotto (Org.). **Ciência animal em debate**. 1^a ed. Cruz das Almas: EDUFRB, 2020, p. 223-241. ISBN: 978-65-87743-38-7.

COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM ABELHAS SEM FERRÃO

Introdução

A importância das abelhas é facilmente estimada pela oferta de produtos de alto valor biológico e econômico como o mel, a própolis, o pólen e a geleia real. No entanto, é a polinização o serviço ecossistêmico prestado por esses insetos que representa de fato a sua maior importância (CHAMBÓ, 2016). Esse serviço possibilita o aumento da variabilidade genética vegetal garantindo a manutenção da biodiversidade, além de incrementar a quantidade e ou qualidade de alimentos cultivados (ROUBIK, 2018). O valor econômico da polinização em nível global varia entre US\$ 235 bilhões e US\$ 577 bilhões (POTTS; IMPERATRIZ-FONSECA; NGO, 2016). No Brasil, calcula-se um valor anual de US\$ 12 bilhões relacionados à produção agrícola (GIANNINI et al., 2015).

É a relação mutualística entre abelhas e plantas que garante a manutenção do serviço de polinização. Aproximadamente 87% das plantas com flores dependem da polinização, principalmente realizada por abelhas (OLLERTON; WINFREE; TARRANT, 2011). Além disso, estima-se que as abelhas sejam responsáveis pela polinização de 75% das plantas cultivadas produtoras de alimentos (POTTS et al., 2016), sendo que no Brasil esse número chega a 89% (GIANNINI et al., 2015). As abelhas sociais *Apis mellifera* e as espécies de abelhas sem ferrão (ASF) respondem por 41% e 39% da polinização de cultivos agrícolas no Brasil, respectivamente (POTTS; IMPERATRIZ-FONSECA; NGO, 2016).

Embora *A. mellifera* seja uma espécie exótica com grande importância na polinização de cultivos por ser capaz de polinizar diversas espécies vegetais de interesse econômico, existem algumas limitações na sua utilização, como a alta defensividade e o manejo das colônias, que exige técnicas e cuidado robustos, a fim de evitar acidentes nas áreas de cultivos. As abelhas nativas, dentre elas as ASF, são consideradas os polinizadores mais importantes de culturas no mundo, com papel independente da *A. mellifera* (GARIBALDI et al., 2013). Desse

modo, a utilização de espécies de ASF para polinização desses cultivos é uma importante estratégia, já que possui vantagens consideráveis como a ausência de ferrão funcional, a baixa defensividade (SLAA et al., 2006) e esforços de manejo menos robustos do que os empregados para *A. mellifera*.

Abelhas sem ferrão

O grupo das abelhas sem ferrão tem distribuição restrita às regiões tropicais e subtropicais, com expressiva diversidade nas regiões neotropicais, com cerca de 400 espécies descritas (CAMARGO; PEDRO, 2013). No Brasil há registro de 244 espécies com nomes válidos e aproximadamente 89 formas ainda não descritas (PEDRO, 2014). Desse total, 101 estão associadas aos cultivos agrícolas, sendo 41 já reconhecidas como polinizadoras, entre as quais 15 com eficiência de polinização confirmada em áreas de cultivo (POTTS; IMPERATRIZ-FONSECA; NGO, 2016).

Além da importância agrícola, ambiental e cultural, essas abelhas também são importantes para o desenvolvimento da meliponicultura, atividade técnica praticada há muitos anos pelos povos indígenas das Américas que visa à produção de mel e demais produtos da colônia (QUEZADA-EUÁN et al., 2018). Essa atividade é desenvolvida em todo o território brasileiro por grandes e pequenos produtores, especialmente de base familiar, nas regiões Norte e Nordeste do país, onde valores socioculturais também estão associados (CARVALHO; ALVES; SOARES, 2003; VENTURIERI et al., 2012).

As espécies pertencentes ao gênero *Melipona* têm destaque na meliponicultura na América Tropical devido aos produtos altamente apreciados e valorizados, assim como pela qualidade do mel produzido (QUEZADA-EUÁN et al., 2018), a exemplo da *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, conhecida popularmente como uruçú (ALVES et al., 2019), e da *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836, conhecida por mandaçaia (BRITO et al., 2013). O sucesso da meliponicultura está atrelado às interações entre a espécie, manejo, nutrição, genética, sanidade e ambiente. Mas, como em qualquer atividade de produção animal, especialmente com adensamento de colônias no plantel, as

abelhas são suscetíveis a doenças, parasitas e contaminações diversas que reduzem os níveis de sanidade das colônias.

Saúde das abelhas

O declínio de polinizadores, especialmente as abelhas, relatado em diversas partes do mundo decorre de uma associação de fatores como alterações do clima, degradação e fragmentação de habitats, o uso de agrotóxicos e a ocorrência de pragas e doenças (GOULSON, 2019). Os aspectos sanitários em ASF são pouco estudados, embora sejam encontrados diferentes registros nas últimas décadas sobre essa temática, como a morte de crias em colônias de *Tetragonula carbonaria* pela bactéria *Lysinibacillus sphaericus* na Austrália (SHANKS et al., 2017). Na América do Sul, as perdas de colônias de ASF podem estar relacionadas a bactérias patogênicas (DÍAZ et al., 2017). Além disso, o microsporídeo *Nosema ceranae*, parasita de *A. mellifera*, apesar de não provocar a morte das colônias, já foi detectado em espécies de abelha sem ferrão da Argentina e do Brasil, inclusive em *M. quadrifasciata anthidioides* (PORRINI et al., 2017), o que eleva a preocupação do nível de sanidade das colônias no plantel.

Resultados positivos para o vírus da paralisia aguda das abelhas (ABPV) foram obtidos em colônias de abelhas brasileiras *Melipona scutellaris* (UEIRA-VIEIRA et al., 2015), e variantes do vírus deformador da asa (DWV) foram encontrados em *Melipona subnitida* (SOUZA et al., 2019). De modo geral, os níveis de doença observados em ASF são baixos se comparados aos relatados em *A. mellifera*, embora não signifique que não há enfermidades nessas abelhas, pois tal quadro, provavelmente, se deve a mecanismos efetivos de controle de patógenos na colônia (AL TOUFAILIA et al., 2016).

Mecanismos de defesa

O repertório de defesa das abelhas sem ferrão reúne mecanismos fisiológicos, anatômicos (SCHORKOPF et al., 2009; LEONHARDT, 2017), produção de antibióticos [própolis e geoprópolis e substâncias cáusticas (GRECO et al., 2010)], além de estratégias comportamentais como mordidas,

deposição de resinas vegetais nos inimigos (COUVILLON et al., 2008; NUNES et al., 2008) e o comportamento higiênico (AL TOUFAILIA et al., 2016; JESUS et al., 2017), que tem se destacado por aumentar os níveis de sanidade das colônias funcionando como controle natural de pragas e doenças.

Comportamento higiênico

O comportamento higiênico (CH) é um mecanismo de defesa expressado pelas abelhas operárias e que está sob forte controle genético (BIGIO; SCHÜRCH; RATNIEKS, 2013). É caracterizado pela remoção de crias mortas, doentes ou parasitadas do interior da colônia (SPIVAK; REUTER, 2008), sendo indicado como o principal fator de resistência das abelhas aos parasitas e organismos patogênicos que ameacem a sanidade das colônias (EVANS; SPIVAK, 2010).

A primeira observação de comportamento higiênico em abelhas foi relatada por Park e colaboradores, em 1930, ao observarem colônias de *A. mellifera* resistentes a *Paenibacillus larvae*, bactéria causadora da Cria Pútrida Americana (ROTHENBUHLER, 1964). Desde então, o comportamento higiênico tem sido estudado frente a outras doenças de cria em abelhas do gênero *Apis*, como a cria- giz (causada pelo fungo *Ascosphaera apis*) (SPIVAK; REUTER, 2001) e a varroatose (causada pelo ácaro *Varroa destructor*) (RASOLOFOARIVAO et al., 2015).

Além da abordagem relacionada à resistência das abelhas às pragas e doenças, os estudos do comportamento higiênico em *A. mellifera* também têm sido realizados visando ao entendimento sobre a associação de diferentes características herdáveis, como a expressão do CH (SWANSON et al., 2009; OXLEY; SPIVAK; OLDROYD, 2010), herdabilidade (STANIMIROVIC et al., 2008; COSTA-MAIA et al., 2011), aumento da produção de mel e pólen (NICODEMO et al., 2013) e estímulos para a remoção das crias (MCAFEE et al., 2018). Esses estudos também poderão ser desenvolvidos com as ASF visando à produção de colônias mais produtivas e resistentes a diferentes fatores bióticos e abióticos.

Para identificar as colônias com alta sensibilidade na remoção de crias mortas ou doentes foram desenvolvidos diversos métodos que têm sido relatados desde os anos 1960 a fim de produzir mortalidade de crias e quantificar sua remoção pelas abelhas. Os bioensaios mais utilizados são: perfuração de crias utilizando alfinete entomológico e congelamento de crias utilizando nitrogênio líquido (GRAMACHO et al., 1999).

Em abelhas sem ferrão os estudos de CH são recentes, datando de 2009 (MEDINA; HART; RATNIEKS, 2009; NUNES- SILVA; IMPERATRIZ-FONSECA; GONÇALVES, 2009), e ainda tratam de questões iniciais desse comportamento, como a eficiência de remoção. Os estudos dessa temática em ASF devem avançar para elucidar questões mais específicas, uma vez que a diversidade e as particularidades das abelhas sem ferrão podem ter ritos do CH distintos daqueles já conhecidos para as espécies do gênero *Apis*.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo o relato de dois casos descritos do comportamento higiênico observado em *Melipona scutellaris* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Foram analisados os resultados dos experimentos realizados com as referidas espécies utilizando-se o método da perfuração de crias com alfinete entomológico e o método do congelamento de crias com nitrogênio líquido; a finalidade foi avaliar o comportamento higiênico das colônias. Os estudos foram realizados na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia entre os anos de 2012 e 2015, no município de Cruz das Almas-Bahia, Brasil.

Perfuração de crias

O método de perfuração consiste em perfurar as crias na idade de pupa dentro dos alvéolos utilizando um alfinete entomológico (NEWTON; OSTASIEWISKI, 1986) e, como medida de avaliação, a colônia é considerada higiênica se a área de teste apresentar remoção superior a 80% dentro de 24 horas (GRAMACHO; GONÇALVES, 1994). Esse método é o mais usado, principalmente por ser econômico e de fácil realização; no entanto tem o inconveniente da possibilidade de fluidos corporais das crias mortas chegarem

à superfície da célula, o que pode estimular a percepção dos danos às crias antecipando sua remoção pelas operárias (GRAMACHO et al., 1999). Contudo, esse método possui praticidade e baixo custo, tornando-o recomendado para aplicação ao nível de campo por apicultores e meliponicultores.

Congelamento de crias

O método de congelamento de crias com nitrogênio líquido (N₂) foi proposto por Spivak e Downey (1998) visando a reduzir a manipulação das áreas de teste para CH. Esse método consiste em delimitar uma área de cria com auxílio de um cilindro, no qual será vertido o nitrogênio líquido, para obtenção de crias mortas por congelamento. O disco de cria é cuidadosamente retirado da colônia para essa etapa. Outra área é igualmente demarcada como controle para posterior comparação. Após o descongelamento da área de cria, o cilindro é retirado e a área devolvida à colônia, calculando-se 24 horas depois o percentual de remoção de crias, que deve ser superior a 95% para que a colônia seja considerada higiênica (SPIVAK; REUTER, 1998).

Comportamento higiênico em *M. scutellaris*

No experimento para avaliação do CH em *M. scutellaris*, foram utilizadas 39 colônias alojadas em caixas de madeira, modelo INPA. O método de perfuração de pupas utilizando de alfinete entomológico número 2 (GRAMACHO; GONÇALVES, 1994) foi aplicado, de modo que, em cada colônia, fosse marcado um conjunto de 50 células de cria com um corretivo atóxico, sendo 25 células marcadas com corretivo branco (controle) e 25 células marcadas com corretivo adicionado corante alimentício rosa para pupas de olho rosa. Um segundo conjunto de 50 células foi marcado com 25 para o controle (corretivo branco) e 25 com corante verde para larva de último instar. As células coradas (rosa e verde) foram perfuradas e avaliadas no período de 24, 48, 72 e 96 horas após a perfuração, quando foi quantificado o número de células removidas (Figura 1).

Figura 1 - (a, b) Perfuração de crias de *Melipona scutellaris* com alfinete entomológico. Área delimitada na cor branca (controle), rosa (pupas de olho rosa) e verde (larvas de último instar);
(c) Remoção de crias por operárias após 24 horas.



Fonte: Averno Insecta/UFRB.

O estudo indicou que 5,40% das colônias foram consideradas higiênicas na remoção de larvas e 2,56% na remoção de pupas (Figura 2), conforme a recomendação de Gramacho e Gonçalves (1994). Apesar do percentual de colônias higiênicas ter sido baixo neste relato de caso, a presença dessa característica no plantel indicou o potencial para a seleção genética das colônias.

Os estudos disponíveis na literatura referentes ao CH em espécies de abelhas sem ferrão revelam uma variação no percentual de remoção das crias mortas. Em *Plebeia remota*, ocorreu remoção de 69,6% em 24 horas com a utilização do método de perfuração (NUNES-SILVA; IMPERATRIZ-FONSECA; GONÇALVES, 2009). Em *Scaptotrigona pectoralis* e *Melipona beecheii* foi verificada remoção de 97% e 66%, respectivamente, 48 horas após os testes, utilizando-se o método de congelamento de pupas (MEDINA; HART; RATNIEKS, 2009). Para *M. scutellaris*, o percentual de colônias higiênicas foi de 90% utilizando-se o congelamento em freezer (AL TOUFAILIA et al., 2016). Embora tenham sido aplicados diferentes métodos, a variação pode representar a diversidade genética entre as espécies e entre as colônias em cada espécie.

Figura 2 - Percentual de colônias de *Melipona scutellaris* e as respectivas remoções categorizadas em faixas de remoção.

Faixa de remoção (%)	Porcentagem de colônias (n=39)							
	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas	
	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa
0-20	86,50	87,18	67,57	76,92	40,54	71,79	27,03	60,00
21-40	2,70	5,13	10,81	12,82	13,51	10,26	5,40	10,00
41-60	5,40	5,13	5,40	5,13	8,11	10,26	2,70	10,00
61-80	0	0	10,82	0	8,11	0	10,81	3,33
81-100	5,40	2,56	5,40	5,13	29,73	7,69	54,06	16,67
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

Fonte: Construído pelos autores, 2020

No estudo com *M. scutellaris*, também foi observada diferença significativa quanto à remoção acumulada de crias na faixa de 81-100% nos períodos de 72 e 96 horas, nos quais a remoção de larvas foi superior à de pupas (Figura 2). As abelhas removiam as larvas mortas com mais facilidade quando em comparação com a remoção das pupas mortas. As operárias geralmente dilaceravam as pupas durante a remoção. Estes resultados indicam que a padronização de uma fase de desenvolvimento da abelha (larva ou pupa) é fundamental na resposta durante a avaliação dos testes de comportamento higiênico.

Além disso, os autores do estudo sugerem que a maior espessura dos opérculos e o cheiro da resina podem mascarar os odores emanados das crias de *M. scutellaris*, sendo necessário mais tempo para detecção e remoção das crias mortas, o que certamente superaria as 24 horas já estabelecidas para *A. mellifera*. De acordo com Morais et al. (2010), o cerume pode reduzir a quantidade de poros nos opérculos, sendo um fator relacionado à eficácia da detecção olfativa das abelhas.

Com relação às diferentes etapas do comportamento, o estudo revelou que *M. scutellaris* segue etapas semelhantes àsquelas realizadas por *A. mellifera*,

mas foi observado que as abelhas operárias, após removerem a cria morta, destroem a célula da qual a cria foi removida. Este mecanismo também foi relatado por outros autores com diferentes espécies de abelha sem ferrão, sendo considerado importante para o controle de doenças e parasitas, já que não há reaproveitamento de células (MEDINA; HART; RATNIEKS, 2009; NUNES-SILVA; IMPERATRIZ-FONSECA; GONÇALVES, 2009). O modo de alimentação das crias em abelhas sem ferrão configura uma diferença importante comparado ao modo de *A. mellifera*. Nas ASF, o alimento é colocado nas células antes da postura dos ovos pela rainha, reduzindo as visitas de operárias às células e favorecendo a sanidade das crias, ao contrário do que ocorre em *A. mellifera*, cujas crias são alimentadas paulatinamente durante o seu desenvolvimento (MAIA-SILVA et al., 2016) e a célula permanece aberta durante a fase larval, o que aumenta a chance de ocorrência de doenças e parasitas.

O estudo também investigou o CH com base no estado de desenvolvimento da colônia e da cria (pupa e larva de último instar), considerando como colônias fortes aquelas instaladas em caixas INPA com dois módulos (ninho e sobre ninho com 10 a 12 discos de crias) e como colônias fracas aquelas que estavam instaladas em apenas um módulo (ninho com 5 a 6 discos de crias), restringindo o espaço de postura da rainha. Para esse parâmetro não foram encontradas diferenças significativas na metodologia aplicada, que relacionou o desenvolvimento da colônia (forte e fraca) com a capacidade de remoção da cria (pupa e larva de último instar). Esse resultado foi semelhante ao observado em colônias de *Plebeia remota* (NUNES-SILVA; IMPERATRIZ-FONSECA; GONÇALVES, 2009).

Comportamento higiênico em *M. quadrifasciata anthidioides*

O comportamento higiênico foi quantificado em 40 colônias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* usando-se o método de congelamento com nitrogênio líquido (N₂) (SPIVAK; REUTER, 1998) adaptado para as dimensões do ninho da espécie em estudo. Em cada colônia foi marcada uma área com sete células de cria contendo pupa de olho negro e sete contendo larvas de último

instar, com suas respectivas áreas de controle (Figura 3a). Com auxílio de um cilindro de PVC (2 cm de diâmetro x 3 cm de altura) colocado sobre as áreas previamente selecionadas (Figura 3b) foram vertidos 12 mL de nitrogênio líquido para o congelamento das crias (Figura 3c).

No estudo, foi analisada a proporção média acumulada de remoção de larvas e pupas mortas em três experimentos realizados em diferentes meses do ano, considerados períodos de teste I, II e III. Além disso, todas as colônias avaliadas para o CH tiveram o tamanho da população estimado antes de cada repetição de acordo com Ihering (1932), após a mensuração do número de células de cria (AIDAR, 2010).

Os percentuais de crias removidas dentro de 48 horas para as 40 colônias estudadas foram de: 75% para larva e 15% para pupas. A média do número de dias para a remoção de todas as larvas mortas por congelamento foi de 2,90 dias e para pupas foi de 5,02 dias.

Em comparação com outras espécies de abelhas sem ferrão, as colônias de *M. q. anthidioides* foram mais eficazes em remover todas as larvas mortas do que *M. beecheii* ($4,4 \pm 2,0$ dias) (média \pm Desvio Padrão) e similar a *Scaptotrigona pectoralis* ($2,3 \pm 0,6$) (MEDINA; HART; RATNIEKS, 2009).

Figura 3 - (a) Disco de cria de *Melipona quadrifasciata anthidioides* com delimitação para teste de comportamento higiênico. Área delimitada na cor branca (controle), cor rosa (larvas de último instar) e cor verde (pupas de olho rosa); (b) aplicação do nitrogênio líquido; (c) operárias realizando o comportamento higiênico.



Fonte: Acervo Insecta/UFRB.

No estudo foi relatado que a população não influenciou a remoção de larvas, embora quanto mais populosa a colônia, mais rápida foi à remoção de pupas.

Ao se considerar a variação do percentual de colônias que removeram mais do que 95% das crias mortas por congelamento até 48 h em cada período de teste, verificou-se que a remoção de larvas variou de 25% no período I para 85% das colônias no período III, e para a remoção de pupas o percentual variou de 4% no período I para 26% das colônias no período III. Isso indica que as variações ambientais nos meses de estudo influenciaram o comportamento higiênico.

Conclusões

Os relatos de casos contribuem para o conhecimento sobre o comportamento higiênico das espécies de ASF, *Melipona scutellaris* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*, que são organismos importantes para a manutenção de serviços ecossistêmicos e para a meliponicultura.

A seleção de colônias com base no comportamento higiênico deverá favorecer os plantéis onde haja maior eficácia na remoção de crias mortas, com consequente aumento nos níveis de sanidade das colônias.

Para *Melipona scutellaris*, o percentual de remoção não foi influenciado pelo tamanho da colônia. Para o estudo de CH nesta espécie recomenda-se o uso de larvas de último instar, uma vez que estas foram removidas mais rapidamente quando na comparação com a remoção das pupas. O tamanho da população influenciou a remoção de pupas de *M. quadrifasciata anthidioides*. Esta descoberta também sugere que o comportamento higiênico deve ser avaliado a partir de larvas de último instar, pois independe do tamanho da população para a eficiência de remoção.

De acordo com os resultados obtidos nos relatos apresentados, os métodos de perfuração e congelamento de crias com nitrogênio líquido são eficientes para avaliação do comportamento higiênico nas espécies estudadas. No entanto, em ambos os estudos se nota que as diferenças nas etapas do comportamento de remoção das crias, aliado às particularidades das espécies, dificultam a interpretação dos resultados. Além disso, a utilização de diferentes métodos nos estudos gera dificuldades para comparar os resultados entre as

espécies. Desse modo, se faz necessário definir um protocolo para estudos de comportamento higiênico nas espécies de abelha sem ferrão considerando essas particularidades.

Referências

AIDAR, D. S. **A mandaçaia**: biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Ribeirão Preto: FUNPEC- Editora, 161 p., 2010.

AL TOUFAILIA, H. et al. Both hygienic and non-hygienic honeybee, *Apis mellifera*, colonies remove dead and diseased larvae from open brood cells. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v.373, n.1751, p.20170201, 2018.

AL TOUFAILIA, H. et al. Hygienic behavior in Brazilian stingless bees. **Biology Open**, Cambridge, v.5, n.11, p.1712-1718, 2016.

ALVES, R. M. O. et al. Correlation between production and biometric parameters in colonies of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Scientific Electronic Archives**, Rondonópolis, v.12, n.1, p.91, 2019.

BIGIO, G.; SCHÜRCH, R.; RATNIEKS, F. L. W. Hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera: Apidae): effects of brood, food, and time of the year. **Journal of Economic Entomology**, Washington, v.106, n.6, p.2280-2285, 2013.

BRITO, B. B. P. et al. Parâmetros biométricos e produtivos de colônias em gerações de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v.62, n.238, p.265-273, 2013.

CAMARGO J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G.A.R. (org.). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. 2013. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em: 9 de junho de 2020.

CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, B. A. **Criação de abelhas sem ferrão**: aspectos práticos. Salvador: SEAGRI-BA, 42 p., 2003.

CHAMBÓ, E. D. **Beekeeping and bee conservation**: advances in research. Rijeka: InTech, 242 p., 2016.

COSTA-MAIA, F. M. et al. Estimates of covariance components for hygienic behaviour in Africanized honeybees (*Apis mellifera*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.40, n.9, p.1909-1916, 2011.

COUVILLON, M. J. et al. Comparative study in stingless bees (Meliponini) demonstrates that nest entrance size predicts traffic and defensivity. **Journal of Evolutionary Biology**, Hoboken, v.21, n.1, p.194-201, 2008.

DÍAZ, S. et al. Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, Amsterdam, v.143, p.35-39, 2017.

EVANS, J. D.; SPIVAK, M. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, Amsterdam, v.103, n.1, p.62-72, 2010.

- GARIBALDI, L. A. et al. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. **Science**, Washington, v.339, p.1608-1611, 2013.
- GIANNINI, T. C. et al. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Washington, v.108, n.3, p.849-857, 2015.
- GOULSON, D. The insect apocalypse, and why it matters. **Current Biology**, Cambridge, v.29, n.19, p.R967-R971, 2019.
- GRAMACHO, K. P. et al. Influence of body fluid from pin-killed honey bee pupae on hygienic behavior. **Apidologie**, Celle, v.30, n.5, p.367-374, 1999.
- GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Estudo comparativo dos métodos de congelamento e perfuração de crias para avaliação do comportamento higiênico em abelhas africanizadas. *In*: CONGRESSO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4, 1994, Rio Cuarto. **Anais [...]**. Rio Cuarto, Córdoba, p. 45, 1994.
- GRECO, M. K. et al. The alternative Pharaoh approach: stingless bees mummify beetle parasites alive. **Naturwissenschaften**, Celle, v.97, n.3, p.319-323, 2010.
- IHERING, H. A. Uruçu na Apicultura Nordestina. **Chácaras e Quintais**, Rio de Janeiro, v.46, p.292-296, 1932.
- JESUS, J. N. et al. Hygienic behavior in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini). **Apidologie**, Celle, v.48, n.4, p.504-512, 2017.
- LEONHARDT, S. Chemical Ecology of Stingless Bees. **Journal of Chemical Ecology**, Celle, v.43, n.4, p.385-402, 2017.
- MAIA-SILVA, C. et al. Stingless bees (*Melipona subnitida*) adjust brood production rather than foraging activity in response to changes in pollen stores. **Journal of Comparative Physiology A**, Celle, v.202, n.9-10, p.723-732, 2016.
- MCAFEE, A. et al. A death pheromone, oleic acid, triggers hygienic behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Scientific Reports**, Celle, v.8, n.1, p.5719, 2018.
- MEDINA, L. M. et al. Hygienic behavior in the stingless bees *Melipona beecheii* and *Scaptotrigona pectoralis* (Hymenoptera: Meliponini). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.8, n.2, p.571-576, 2009.
- MORAIS, M. M. et al. A scientific note about spectroscopic analysis of honey bee brood comb cappings in hygienic and non-hygienic honey bee colonies. **Apidologie**, Celle, v.41, n.5, p.531-533, 2010.
- NEWTON, D.; OSTASIEWSKI, N. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). **American Bee Journal**, Hamilton, v.126, n.4, p.278-281, 1986.
- NICODEMO, D. et al. Honey bee lines selected for high propolis production also have superior hygienic behavior and increased honey and pollen stores. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.12, n.1, p.6931-6938, 2013.
- NUNES, T. M. et al. Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? **Animal Behaviour**, Amsterdam, v.75, n.3, p.1165- 1171, 2008.

NUNES-SILVA, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. P.; GONÇALVES, L. S. Hygienic behavior of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.2, n.2, p.649-654, 2009.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, Hoboken, v.120, n.3, p.321-326, 2011.

OXLEY, P. R.; SPIVAK, M.; OLDROYD, B. P. Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). **Molecular Ecology**, Hoboken, v.19, n.7, p.1452-61, 2010.

PEDRO, S. R. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, Feira de Santana, v.61, n.4, p.348-354, 2014. (Special Issue)

PORRINI, M. P. et al. *Nosema ceranae* in South American native stingless bees and social wasp. **Microbial Ecology**, Celle, v.74, n.4, p.761-764, 2017.

POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NGO, H. T. (ed). **The assessment report on pollinators, pollination and food production of the intergovernmental science-policy platform on biodiversity and ecosystem services**. Intergovernmental Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. Bonn, IPBES, 552 p., 2016.

POTTS, S. G. et al. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, Celle, v.540, n.7632, p.220, 2016.

QUEZADA-EUÁN, J. J. G. et al. Economic and cultural values of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) among ethnic groups of Tropical America. **Sociobiology**, Feira de Santana, v.65, n.4, p.534- 557, 2018.

RASOLOFOARIVAO, H. et al. Assessing hygienic behavior of *Apis mellifera unicolor* (Hymenoptera: Apidae), the endemic honey bee from Madagascar. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.14, n.2, p.5879-5889, 2015.

ROTHENBUHLER, W. C. Behavior genetics of nest cleaning behavior in honeybees. I. Response of four inbred lines to disease killed brood. **Animal Behaviour**, Amsterdam, v.12, n.4, p.578-583, 1964.

ROUBIK, D. W. **The pollination of cultivated plants: a compendium for practitioners**. Rome: Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), 2018.

SCHORKOPF, D. L. P. et al. Mandibular gland secretions of meliponine worker bees: further evidence for their role in interspecific and intraspecific defense and aggression and against their role in food source signaling. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v.212, n.8, p.1153- 1162, 2009.

SHANKS, J. L. et al. First confirmed report of a bacterial brood disease in stingless bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, Amsterdam, v.144, n.1, p.7-10, 2017.

SLAA, E. J. et al. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, Celle, v.37, n.2, p.293-315, 2006.

SOUZA, F. S. et al. Occurrence of deformed wing virus variants in the stingless bee *Melipona subnitida* and honey bee *Apis mellifera* populations in Brazil. **Journal of General Virology**, London, v.100, n.2, p.289-294, 2019.

SPIVAK, M.; DOWNEY, D. L. Field assays for hygienic behavior in honey bees (Apidae: Hymenoptera). **Journal of Economic Entomology**, Washington, v.91, n.1, p.64–70, 1998.

SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Honey bee hygienic behavior. **American Bee Journal**, Hamilton, v.138, n.4, p.283-286, 1998.

SPIVAK, M.; REUTER, G. S. New direction for the Minnesota hygienic line of bees. **American Bee Journal**, Hamilton, v.148, n.1, p.1085-1086, 2008.

SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. **Apidologie**, Celle, v.32, p.555-565, 2001.

STANIMIROVIC, Z. et al. Heritability of hygienic behavior in grey honey bees (*Apis mellifera carnica*). **Acta Veterinaria**, Beograd, v.58, n.5-6, p.593-601, 2008.

SWANSON, J. A. I. et al. Odorants that induce hygienic behavior in honeybees: identification of volatile compounds in chalkbrood- infected honeybee larvae. **Journal of Chemical Ecology**, Celle, v.35, n.9, p.1108-1116, 2009.

UEIRA-VIEIRA, C. et al. Scientific note on the first molecular detection of the acute bee paralysis virus in Brazilian stingless bees. **Apidologie**, Celle, v.46, n.5, p.628-630, 2015.

VENTURIERI, G. C. et al. Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola. *In*: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CANHOS, D. A. L.; ALVES, D. de A.; SARAIVA, A. M. (org.). **Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo: EDUSP, p.213- 236, 2012.

ARTIGO II

COMPOSTOS VOLÁTEIS EMANADOS DE CRIAS de *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEPELETIER, 1836 (APIDAE, MELIPONINAE) MORTAS POR DIFERENTES TÉCNICAS DE ESTUDO DO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO¹

¹Artigo será reajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico *Journal of Apicultural Research*, em versão na língua inglesa.

COMPOSTOS VOLÁTEIS EMANADOS DE CRIAS DE *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEPELETIER, 1836 (APIDAE, MELIPONINAE) MORTAS POR DIFERENTES TÉCNICAS PARA ESTUDO DO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO

Resumo: O comportamento higiênico (CH) das abelhas é considerado um importante mecanismo de controle de pragas e patógenos nas colônias. O objetivo desse estudo foi identificar o perfil de compostos voláteis de pupas e larvas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, mortas por três diferentes técnicas de indução da morte para estudos de CH (congelamento em nitrogênio líquido, congelamento em freezer e perfuração com alfinete entomológico). Os compostos foram obtidos por microextração em fase sólida em modo *headspace* (HS-SPME, Headspace Solid Phase Microextraction) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). Os grupos funcionais mais frequentes dentre os compostos identificados foram hidrocarbonetos, seguido dos sesquiterpenos e álcoois. Cetonas, aldeídos, ésteres e ácidos carboxílicos também foram identificados em menor número. O perfil de compostos obtido por HS-SPME/GC-MS associado à análise multivariada de dados leva à discriminação das técnicas testadas e das fases de desenvolvimento das crias. A remoção de crias mortas entre as três técnicas em dois tempos de avaliação da remoção (T24 e T48) verificada no experimento comportamental, diferiu estatisticamente ($p > 0,05$), sendo a maior média em 24 horas observada para a técnica de congelamento em nitrogênio líquido, seguida do congelamento em freezer e da perfuração. A fase larval foi preferencialmente removida em detrimento da fase de pupa, independente da técnica utilizada. Houve diferença estatística entre o tempo de avaliação e as interações entre os tratamentos e também com a fase das crias. Neste estudo, foi demonstrado que tanto a técnica utilizada para avaliar o CH das colônias quanto o estágio de desenvolvimento da cria exibem perfis químicos diferentes, que podem influenciar na remoção da cria e conseqüentemente na classificação da colônia como higiênica ou não higiênica.

Palavras chaves: Abelhas sem ferrão; Compostos orgânicos voláteis; Remoção de ninhada morta; SPME/CG-MS

VOLATILE COMPOUNDS EMANATING FROM BROOD OF *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEPELETIER, 1836 (APIDAE, MELIPONINAE) KILLED BY DIFFERENT TECHNIQUES TO STUDY HYGIENIC BEHAVIOR

Abstract: The hygienic behavior of bees is considered an important control mechanism of pests and pathogens in colonies. This study aimed to identify the profile of volatile compounds in pupae and larvae of *Melipona quadrifasciata anthidioides*, killed by three different death induction techniques (freezing in liquid nitrogen, freezing in freezer, and pin-killed). The compounds were obtained by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The most frequent functional groups among the identified compounds were hydrocarbons, followed by sesquiterpenes and alcohols. Smaller amounts of ketones, aldehydes, esters, and carboxylic acids were recognized. The compounds profile obtained by HS-SPME/GC-MS associated with the data multivariate analysis leads to the discrimination of techniques tested and the stages of the offspring development. The removal of dead offspring among the three methods in two removal evaluation times (T24 and T48), verified in the behavioral experiment, differed statistically ($p > 0.05$), with the highest average in 24 hours observed for the freezing technique in liquid nitrogen, followed by freezing in a freezer and pin-killed. The larval stage was preferentially removed compared to the pupal stage, regardless of the procedure used. There was a statistical difference between the evaluation time and interactions between treatments and offspring stage. Both techniques used to evaluate the colonies' hygienic behavior and brood development stage exhibit different chemical profiles, which may affect brood removal and, consequently, the classification of the colony as hygienic or unhygienic.

Keywords: Stingless bees; Volatile organic compounds; Removal of dead brood; SPME/GC-MS

Introdução

O comportamento higiênico (CH) das abelhas é um importante mecanismo de defesa contra pragas e doenças da colônia (SPIVAK; DANKA, 2021), uma vez que as crias insalubres são identificadas e removidas da colônia eliminando o agente patogênico antes da sua proliferação (WILSON-RICH *et al.*, 2009). Esse comportamento pode ser mensurado em colônias saudáveis por meio da indução da morte de uma área de cria, para tanto, foram desenvolvidas diferentes técnicas de congelamento em freezer (NEWTON; CANTEWELL; BOURQUIN, 1975), em nitrogênio líquido (SPIVAK; REUTER, 1998) e de perfuração utilizando alfinete entomológico (GRAMACHO; GONÇALVES, 1994; NEWTON; OSTASIEWSKI, 1986). No entanto, não há consenso acerca de qual técnica é mais apropriada, sendo relatadas vantagens e desvantagens para cada uma delas (LECLERCQ *et al.*, 2018).

Considerando que a motivação para remoção é baseada em compostos voláteis emanados das crias, que são percebidos pelas abelhas operárias higiênicas (BIGIO; SCHÜRCH; RATNIEKS, 2013; SWANSON *et al.*, 2009), a técnica de perfuração embora seja relativamente prática, ao violar o opérculo (camada superficial de cera da célula) por meio da perfuração, pode trazer à superfície das células os fluidos e odores das crias mortas, provocando um estímulo à percepção dos danos, e antecipar a sua remoção pelas operárias (GRAMACHO *et al.*, 1999). Por outro lado, as técnicas de congelamento parecem não causar danos às células de cria, no entanto, exigem maior estrutura para execução, o que dificulta os testes em campo. As técnicas de congelamento são preferencialmente utilizadas nas pesquisas por causar menos perturbações à colônia e conferir maior confiabilidade aos resultados (LECLERCQ *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2006). Apesar dessas discussões, ao que se sabe até então, nenhum trabalho se dedicou a verificar a remoção de crias mortas por meio das diferentes técnicas simultaneamente em espécies de abelha sem ferrão (ASF) e avaliar as diferenças entre o perfil de compostos orgânicos voláteis (COV's) emitidos das crias comparando-se as diferentes técnicas.

A hipótese desta pesquisa é que (i) existe diferença no perfil de compostos orgânicos voláteis emanados de crias mortas mediante a escolha da técnica de

CH; (ii) o perfil de compostos difere com base na fase de desenvolvimento da cria escolhida para o teste; (iii) operárias removem mais crias mortas por perfuração quando comparadas às técnicas de congelamento; (iv) larvas são preferencialmente removidas em detrimento de pupas, independente da técnica utilizada. Com os resultados desse trabalho espera-se contribuir para a compreensão da base química envolvida no comportamento higiênico, sobretudo em abelhas sem ferrão, nas quais são incipientes os estudos de CH.

Material e Métodos

Coleta de amostras

Para realização do experimento de coleta de compostos voláteis, foram utilizadas seis colônias de *M. quadrifasciata anthidioides*, alojadas em caixas padronizadas modelo INPA constituídas de ninho e sobreninho (13 x 13 x 6 cm), melgueira (13 x 13 x 3,5 cm), tampa e fundo (18 x 18 x 2 cm) e espaço interno para acesso entre os compartimentos (6 x 6 cm). As colônias foram instaladas em meliponário coletivo situado na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, campus de Cruz das Almas, BA. De cada colônia, foram coletadas seis áreas de teste (conjunto de sete células de cria), sendo três na fase de larva de último ínstar e três de pupa, totalizando 36 amostras, que foram submetidas às técnicas de perfuração com alfinete entomológico (0,45 mm) (GRAMACHO; GONÇALVES, 1994), congelamento em Nitrogênio líquido (-196 °C) (SPIVAK; REUTER, 1998) e congelamento em freezer (-20 °C) durante 24 horas para obtenção de crias mortas (NEWTON; CANTEWELL; BOURQUIN, 1975).

Após a aplicação de cada técnica, 12 amostras foram imediatamente congeladas (T0), sendo seis de larva e seis de pupa. As demais amostras foram devolvidas às suas respectivas colônias, onde ficaram protegidas do contato com as operárias, sendo recobertas com tecido *voil*. Após 24 e 48 horas (T24 e T48, respectivamente) as amostras foram retiradas das colônias e acondicionadas em recipientes de vidro hermeticamente fechados e levadas a ultrafreezer (-80 °C) até serem analisadas.

Extração de Compostos Orgânicos Voláteis (COV's)

A extração dos compostos voláteis de crias de *M. quadrifasciata anthidioides* foi realizada utilizando a técnica de microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME, Headspace Solid Phase Microextraction), com um amostrador manual. Para tanto, cada fase de cria foi colocada em um frasco de vidro tipo *vial* (20 ml), posteriormente selado. A extração foi realizada colocando o frasco em um bloco de aquecimento de alumínio (4 cm de altura × 14 cm de diâmetro) sobre uma placa de aquecimento com temperatura controlada a 70 °C. A extração dos COV's foi feita utilizando a fibra do tipo Carboxen / PDMS com 75 µm (Supelco®, Bellefonte, Pensilvânia, EUA) previamente condicionada de acordo com as instruções do fabricante. Esse tipo de fibra já foi utilizado em estudo com abelhas realizado por Zhao *et al.* (2015). Após um período de extração de 30 min, a fibra foi inserida no injetor do cromatógrafo a gás por 4 min a 250 °C para dessorção dos COV's.

Análise e Identificação de Compostos Orgânicos Voláteis

Os compostos voláteis presentes nas amostras foram detectados usando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (modelo GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu®, Japão), o injetor operou no modo *splitless* a 250 °C durante a corrida cromatográfica. Os COV's foram separados e detectados utilizando-se uma coluna capilar HP-5 MS (30 m, 0,25 mm id × 0,25 µm) (Agilent®, Palo Alto, Califórnia, EUA) e 0,59 mL min⁻¹ de fluxo de gás Hélio, com a seguinte programação de temperatura: 45 °C por 3 min, 1 °C min⁻¹ a 90 °C, por 1 min; 1 °C min⁻¹ a 140 °C por 1 min, 5 °C min⁻¹ a 220 °C; 10 °C min⁻¹ a 300 °C (tempo total de 124 min). As condições do detector foram: temperatura da linha de transferência de 220 °C, temperatura da fonte de íons de 220 °C e modo de ionização com impacto de elétrons a 70 eV.

A identificação dos COV's foi obtida (i) comparando os tempos de retenção e os espectros de massa do GC; (ii) todos os espectros de massa também foram comparados com a biblioteca do sistema de dados (NIST08, NIST08s); (iii) os valores do índice de retenção de Kovats (KI) foram

determinados utilizando uma série homóloga de n-alcenos C₈-C₄₀ (40ppm) e comparados com os valores reportados na literatura para colunas cromatográficas semelhantes, e (iv) os compostos identificados foram confirmados por meio da sobreposição de cromatogramas de padrões sintéticos disponíveis, e analisados nas mesmas condições cromatográficas.

Os padrões usados para confirmação foram benzeneacetaldeído (>90% de pureza, Sigma-Aldrich®), bezaldeído (99% de pureza, FLUKA®), α -cariofileno (98,5% de pureza, Sigma-Aldrich®), pentadecano (99% de pureza, Sigma-Aldrich®), ácido dodecanoico (99,5% de pureza, FLUKA®), heptadecano (99% de pureza, Sigma-Aldrich®). Para confirmação dos alcanos pentacosano, heneicosano, docosano, tricosano e tetracosano, foi utilizado o padrão de alcanos C₈-C₄₀ (99,5% de pureza, Sigma-Aldrich®).

Experimento comportamental

O experimento comportamental foi realizado em colônias de *M. quadrifasciata anthidioides*, alojadas em caixas padronizadas modelo INPA. Em cada colônia (n = 7), foram delimitadas seis áreas de cria contendo sete larvas e sete pupas cada, nas quais foram aplicadas as diferentes técnicas para avaliação do comportamento higiênico das colônias (perfuração com alfinete entomológico, congelamento em freezer e congelamento em nitrogênio líquido), já descritas anteriormente. Assim, em cada colônia foram marcadas 42 células de cria. Após os testes, foi realizada avaliação de remoção das áreas de testes em 24 e 48 horas. Para cada técnica e fase da cria foi utilizada uma marcação com tinta atóxica a base de água, corada com anilina comestível. Uma área de controle também foi marcada para indicar que a marcação com tinta não estimula a remoção em crias intactas, uma vez que não foi observada remoção nessas áreas. O teste foi repetido após 20 dias, totalizando 168 observações.

Análise estatística

Comparações descritivas dos perfis químicos entre as técnicas e fases das crias foram feitas por visualização da presença ou ausência de picos individuais. Para análise multivariada dos COV's foi utilizado o software MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). A base de dados foi adaptada de acordo com o objetivo de cada análise, mas de modo geral incluía informações de abundancia relativa dos picos, e os diferentes parâmetros avaliados (técnicas, tempos de avaliação e fase das crias). O processamento de dados aplicou uma verificação de integridade, verificação de valor ausente, filtro IQR (Intervalo Interquantil) dos dados e normalização, e posteriormente aplicada a Análise de Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais (OPLS-DA) que decompõe o conjunto de dados e faz predições em relação à classificação das amostras visando obter a discriminação de perfis de compostos entre as técnicas e fases das crias.

Para os dados de comportamento foi utilizado o software R (versão 4.0.2) (R Development Core Team, 2020), e realizada a análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial triplo, seguido do teste de Tukey para comparação das médias diferentes na estatística F com 0,05 de significância.

Resultados

Perfil geral de compostos voláteis

A partir das análises cromatográficas foram obtidos 36 cromatogramas, dos quais puderam ser identificados 42 compostos (Tabela1). Os compostos pertencem a diversos grupos funcionais, sendo o mais abundante os hidrocarbonetos, seguido dos sesquiterpenos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e ácidos carboxílicos, que juntos, correspondem a 90 % dos compostos identificados. Os demais compostos identificados pertencem aos grupos éter, amina e fenol.

Estes compostos variaram com relação à presença/ausência entre as fases de larva e pupa nos tratamentos de congelamento em Nitrogênio líquido

(NIL), congelamento em freezer (FRZ) e perfuração de crias com alfinete entomológico (PER) (Tabela1). Alguns compostos foram identificados exclusivamente na técnica de congelamento NIL (3-nonen-2-ona; 3,4-dimetoxiestireno; α -cariofileno; cubeneno) e três compostos foram exclusivos na técnica de PER (3-hepten-2-ona; fenilmetilcarbinol; 4-vinilguaiacol). A técnica de congelamento FRZ compartilhou dos compostos comuns às demais técnicas. Dezesete compostos foram comuns a todas as fases da cria e técnicas testadas, em sua maioria pertencente ao grupo dos hidrocarbonetos.

Tabela 1. Compostos orgânicos voláteis (COV's) identificados em crias de *M. quadrifasciata anthidioides* mortas por diferentes técnicas para avaliação de comportamento higiênico.

Nº	Composto	TR (min)	IK _{Exp}	IK _{Lit}	Grupo funcional	NIL		PER		FRZ	
						Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa
1	2-heptanol	11.225	902	902	Álcool	-	-	X	X	X	X
2	3-hepten-2-ona	13.849	939	942	Cetona	-	-	X	-	-	-
3	benzaldeído*	15.541	960	960	Aldeído	-	-	X	X	X	X
4	benzeacetaldéido*	23.739	1043	1043	Aldeído	X	X	X	X	X	X
5	Fenilmetilcarbinol	25.699	1060	1061	Álcool	-	-	-	X	-	-
6	Acetofenona	26.034	1063	1062	Cetona	X	X	X	X	X	X
7	2-nonanona	29.708	1092	1091	Cetona	X	X	-	X	-	-
8	álcool fenético	31.640	1108	1110	Álcool	X	X	X	X	X	X
9	3-nonen-2-ona	35.452	1141	1141	Cetona	X	X	-	-	-	-
10	4-vinilanisol	36.451	1149	1150	Éter	X	X	X	X	X	X
11	Naftaleno	39.383	1172	1178	Hidrocarboneto aromático	X	X	X	X	X	X
12	Indol	54.585	1286	1292	Amina	X	-	X	-	X	-
13	4-vinilguaiacol	57.417	1307	1306	Fenol	-	-	X	-	-	-
14	α-cubebeno	61.778	1343	1343	Sesquiterpeno	-	X	-	X	X	-
15	3,4-dimetoxiestireno	64.824	1366	1368	Éter	X	X	-	-	-	-
16	β-bourboneno	65.817	1374	1374	Sesquiterpeno	-	X	-	X	-	-
17	ácido decanóico	66.710	1380	1380	Ácido carboxílico	X	X	-	-	X	X
18	octil ciclohexano	73.900	1438	1442	Éster	-	X	-	X	X	X
19	α-cariofileno*	74.123	1440	1440	Sesquiterpeno	X	X	-	-	-	-
20	trans-geranilacetona	75.222	1449	1449	Cetona	-	-	-	X	-	X
21	5,9-undecadien-2-ol,6,10-dimetil	75.416	1451	1454	Álcool	X	-	-	X	X	-

22	2-tridecanona	80.744	1493	1494	Cetona	X	X	X	X	-	-
----	---------------	--------	------	------	--------	---	---	---	---	---	---

Tabela 1. Continua

Nº	Composto	TR (min)	IK _{Exp}	IK _{Lit}	Grupo funcional	NIL		PER		FRZ	
						Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa
23	pentadecano*	81.367	1498	1500	Alcano	X	X	X	X	X	X
24	germacrene D	81.500	1499	1499	Sesquiterpeno	-	X	-	X	X	-
25	δ-cadineno	83.050	1513	1514	Sesquiterpeno	X	X	-	X	-	X
26	Cubeneno	83.901	1520	1524	Sesquiterpeno	-	X	-	-	-	-
27	ácido dodecanóico, éster metílico	84.233	1523	1523	Éster metílico	-	X	X	X	X	X
28	ácido dodecanóico*	90.594	1578	1578	Ácido carboxílico	X	X	X	-	X	X
29	ácido dodecanóico etil éster	92.459	1594	1594	Éster	X	X	X	X	X	X
30	Tetradecanal	93.985	1608	1608	Aldeído	X	X	X	-	-	-
31	1-tetradecanol*	101.148	1679	1679	Álcool	X	X	X	X	X	X
32	1-heptadeceno	101.263	1680	1682	Alceno	X	X	X	X	X	X
33	heptadecano*	103.158	1698	1700	Alcano	X	X	X	X	X	X
34	ácido pentadecanóico	106.880	1869	1869	Ácido carboxílico	X	X	X	-	X	X
35	ácido hexadecanóico	108.500	1964	1964	Ácido carboxílico	X	X	-	X	-	-
36	Octadecanal	108.716	2003	2010	Aldeído	X	X	X	X	X	X
37	octadecanol	110.776	2074	2077	Álcool	X	X	X	X	X	X
38	heneicosano*	111.451	2097	2100	Alcano	X	X	X	X	X	X
39	docosano*	114.025	2196	2200	Alcano	X	X	X	X	X	X
40	tricosano*	116.247	2296	2300	Alcano	X	X	X	X	X	X
41	tetracosano*	117.959	2394	2400	Alcano	X	X	X	X	X	X
42	pentacosano*	119.380	2496	2500	Alcano	X	X	X	X	X	X

TR (min) = tempo de retenção do composto; IK_{Exp} = Índice de retenção obtido no experimento; IK_{Lit} = Índice de Kovats obtido na literatura; (*) Compostos confirmados com injeção de padrão sintético; (X) = indica presença do composto e (-) indica ausência; NIL = congelamento em nitrogênio líquido; PER = perfuração de crias com alfinete entomológico; FRZ = congelamento de crias em freezer.

Perfil de compostos voláteis de larvas e pupas

A partir da análise de Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais - Análise Discriminante (OPLS-DA) foi possível visualizar uma diferença de perfil entre larvas e pupas. O gráfico de *scores* (Figura 1) mostra que independente da técnica utilizada para obtenção das crias mortas existe uma separação de COV's para os grupos de cria, representados pelas elipses. Os compostos que mais discriminaram os perfis de cada fase estão relacionados no gráfico de Importância da Variável na Projeção (VIP) (Figura1B), derivado da análise de OPLS-DA, no qual pode-se observar que a maioria dos compostos é mais abundante nas larvas, estes pertencem em sua maioria aos grupos funcionais: ácido carboxílico, álcool e cetona. Enquanto nas pupas os compostos mais abundantes são hidrocarbonetos, terpeno e álcool.

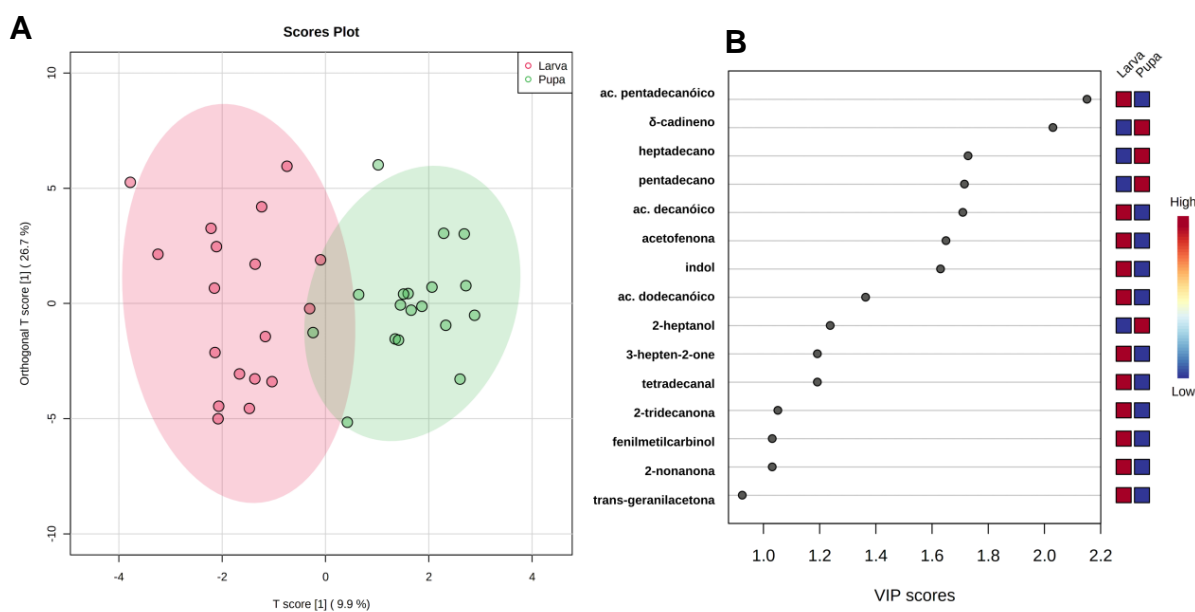


Figura 1. (A) Gráfico de pontuação OPLS-DA para crias mortas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* na fase de larva e pupa, analisadas a partir de Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (SPME-CG-MS); (B) gráfico de pontuação VIP da análise multivariada OPLS-DA. À esquerda do gráfico de pontuação VIP, indica em ordem decrescente os compostos que mais discriminaram os perfis das crias. À direita do gráfico de pontuação VIP, a escala de cor varia de azul (baixa abundância) a vermelho (alta abundância).

Perfil de COV's de larvas e pupas versus técnicas

Em seguida, foi realizada a análise de OPLS-DA utilizando dados de cada fase frente às técnicas NIL, PER e FRZ, a fim de testar a hipótese de que existe diferença no tipo de COV's emanados de crias mortas em razão da técnica de CH. Nesta análise, os dados de larvas formaram claramente três grupos, delineando cada técnica (Figura 2). Os compostos mais importantes da projeção são apresentados na Figura 2B. Dos principais compostos, o ácido decanoico e ácido dodecanoico etil éster estavam em maior abundância em FRZ e menor em PER e NIL, respectivamente. A 2-tridecanona, estava em maior abundância em PER e menor abundância em FRZ e NIL. Já o tetracosano mais abundante em FRZ, e menor em NIL.

Dentre os 15 compostos discriminantes, a maioria estava em maior abundância em FRZ e menor abundância em NIL. Nota-se que os compostos exclusivos da técnica NIL não aparecem como discriminantes entre as técnicas. Daqueles exclusivos para a técnica PER apenas o 3-hepten-2-ona contribuiu para a separação dos grupos.

Alguns compostos discriminantes da análise de fases de cria (ácido pentadecanóico, ácido decanóico, ácido dodecanoico, 2-tridecanona, 3-hepten-2-ona e tetradecanal), também aparecem na análise de larvas entre as técnicas. Nessa análise, o ácido pentadecanoico e dodecanoico estão em maior abundância em NIL, o ácido decanoico em maior abundância em FRZ e menos em PER. Já a 2-tridecanona, 3-hepten-2-ona e tetradecanal estão mais abundantes em PER e menos abundantes em NIL.

A análise OPLS-DA também foi aplicada para o conjunto de dados de pupas associado às técnicas, cujos gráficos estão apresentados na Figura 3. Nessa análise, nenhum composto discriminante de pupas da análise de fases contribuiu na separação de técnicas. Com relação aos compostos exclusivos, apenas o da técnica PER (fenilmetilcarbinol) contribuiu para a separação dos grupos. Os principais compostos discriminantes, ácido hexadecanoico etricosano estavam em maior abundância em PER, já o ácido dodecanoico etil

éster mais abundante em FRZ e menos em PER. O ácido dodecanoico mais abundante em NIL e menos abundante em PER.

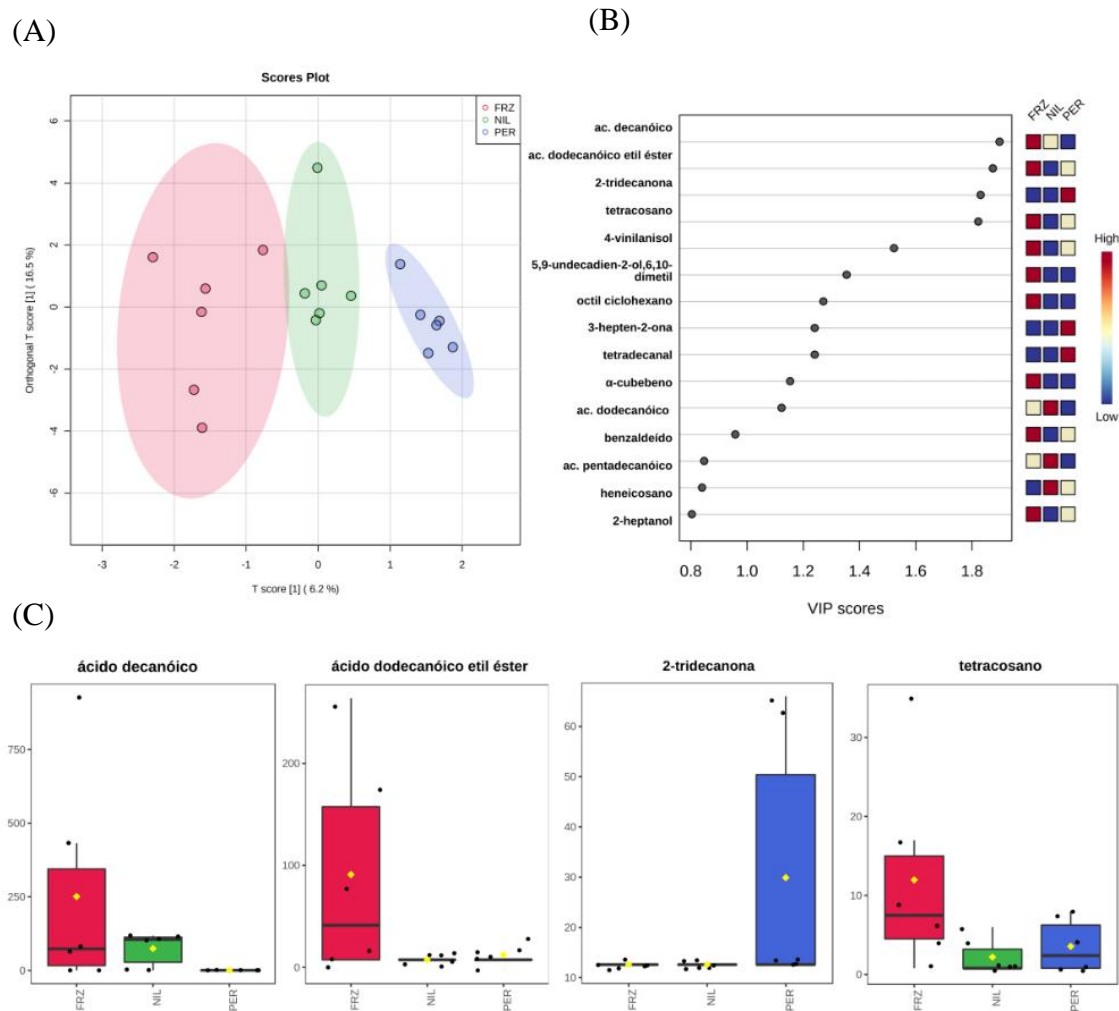


Figura 2. (A) Gráfico de pontuação OPLS-DA obtido da associação de intensidade dos picos de compostos orgânicos emanados de larvas mortas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* por meio das técnicas de perfuração utilizando alfinete entomológico e congelamento em nitrogênio líquido e em freezer. (B) gráfico de pontuação VIP da análise OPLS-DA. À esquerda do gráfico de pontuação VIP, indica em ordem decrescente os compostos que mais discriminaram os perfis das técnicas. À direita do gráfico de pontuação VIP, a escala de cor varia de azul (baixa abundância) a vermelho (alta abundância). (C) No *boxplot*, o eixo Y representa as intensidades normalizadas dos compostos como quartil para cada grupo de amostra. O intervalo da escala vertical é do valor mínimo ao máximo do grupo selecionado, ou, o maior ou o menor dos pontos de referência exibidos, mediana e intervalo de confiança de 95 %.

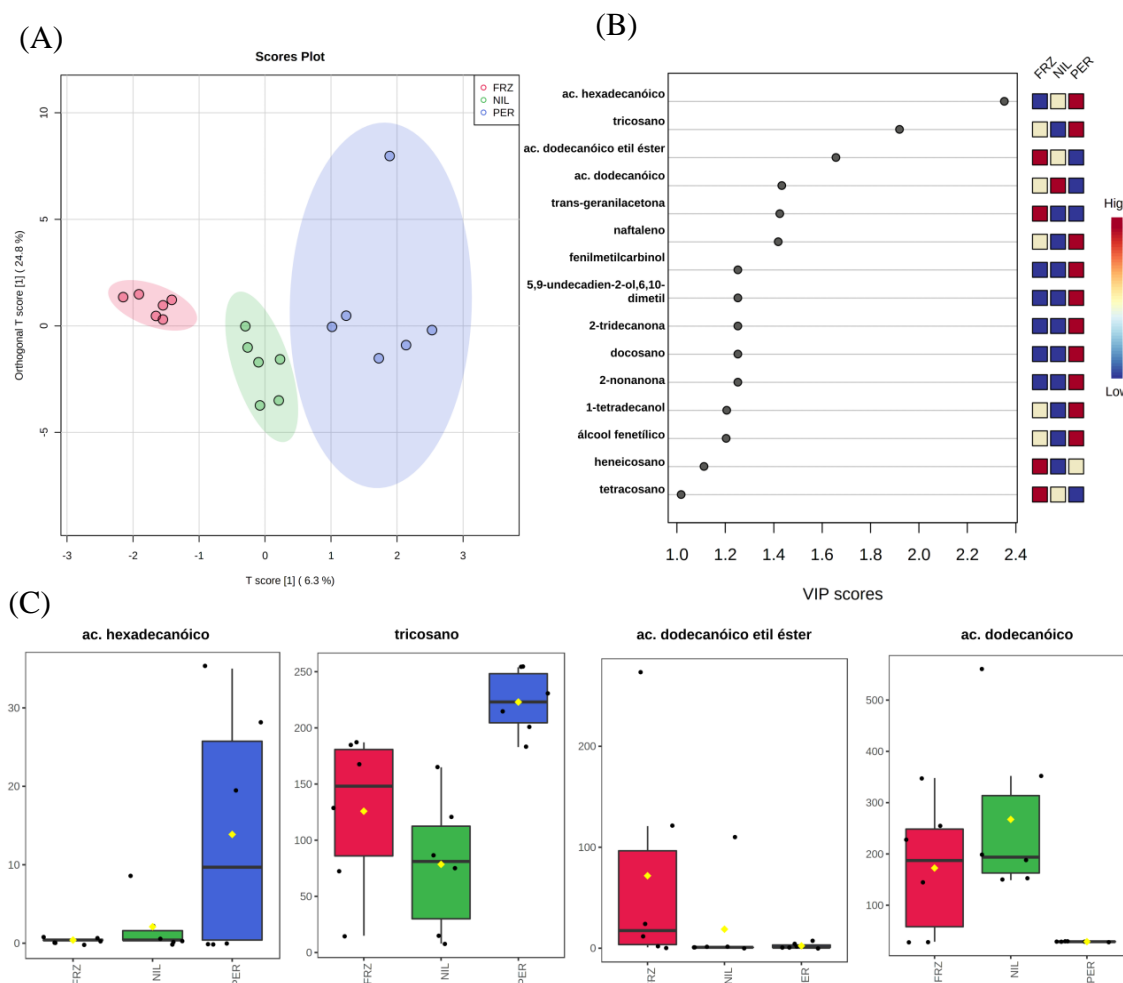


Figura 3. (A) Gráfico de pontuação OPLS-DA obtido da associação de intensidade dos picos de compostos emanados de pupas mortas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* por meio das técnicas de perfuração utilizando alfinete entomológico e congelamento em nitrogênio líquido e em freezer. (B) gráfico de pontuação VIP da análise OPLS-DA de pupas nas técnicas. À esquerda do gráfico de pontuação VIP, indica em ordem decrescente os compostos que mais discriminaram os perfis das técnicas. À direita do gráfico de pontuação VIP, a escala de cor varia de azul (baixa abundância) a vermelho (alta abundância). (C) No *boxplot*, o eixo Y representa as intensidades normalizadas dos compostos como quartil para cada grupo de amostra. O intervalo da escala vertical é do valor mínimo ao máximo do grupo selecionado, ou, o maior ou o menor dos pontos de referência exibidos, mediana e intervalo de confiança de 95 %.

De modo geral, dos 15 compostos discriminantes a maioria estava em maior abundância em PER e menor abundância em NIL. Os grupos químicos desses compostos são principalmente ácido carboxílico, hidrocarboneto, álcool e cetona.

Perfil de lcompostos voláteis de arvas e pupas versus tempos de avaliação da remoção

Para essa análise, foram selecionados os seis compostos que mais discriminaram os perfis de larva e pupa entre as técnicas e associados os tempos de avaliação de remoção das crias (T0, T24 e T48 horas) aos dados. Assim, foi possível obter gráficos evidenciando a distribuição de cada composto ao longo do tempo de avaliação. A Figura 4 mostra a análise com base nos dados de larvas.

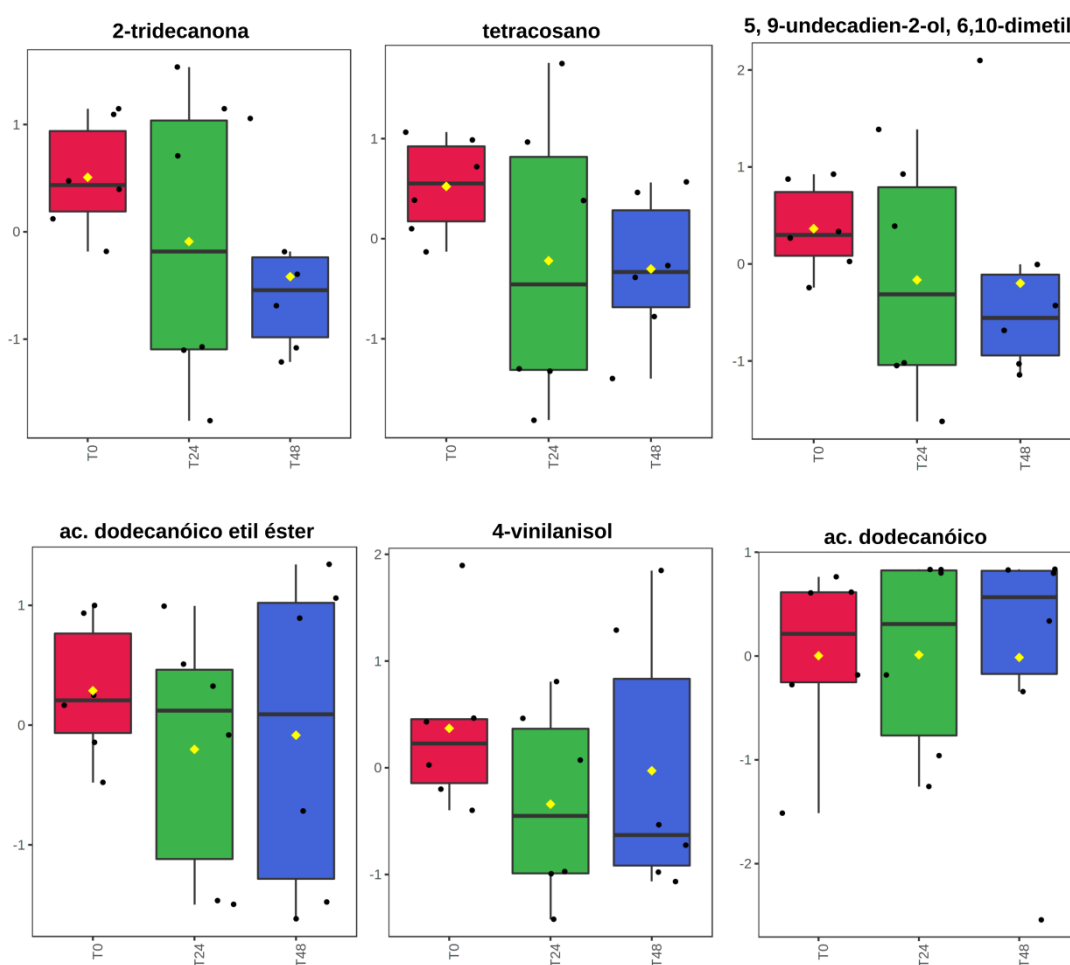


Figura 4. Boxplot obtido a partir da análise dos compostos mais abundantes na análise de larvas mortas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, associada técnicas de perfuração utilizando alfinete entomológico, congelamento em nitrogênio líquido e em freezer. O eixo Y representa as intensidades normalizadas dos compostos como quartil para cada grupo de amostra. O intervalo da escala vertical é do valor mínimo ao máximo do grupo selecionado, ou, o maior ou o menor dos pontos de referência exibidos, mediana e intervalo de confiança de 95 %.

Essa análise revelou que, para os dados de larva, cinco dos seis compostos mais importantes apresentavam maior abundância no T0, tempo logo após a morte das crias. Apenas o ácido dodecanoico estava mais abundante em T24 horas.

Para os dados de pupa relacionados com o tempo de avaliação, os compostos mais abundantes no T0 foram: tricosano, naftaleno e ácido hexadecanoico (Figura 5). O ácido dodecanoico etil éster foi o composto com menor abundância no tempo inicial.

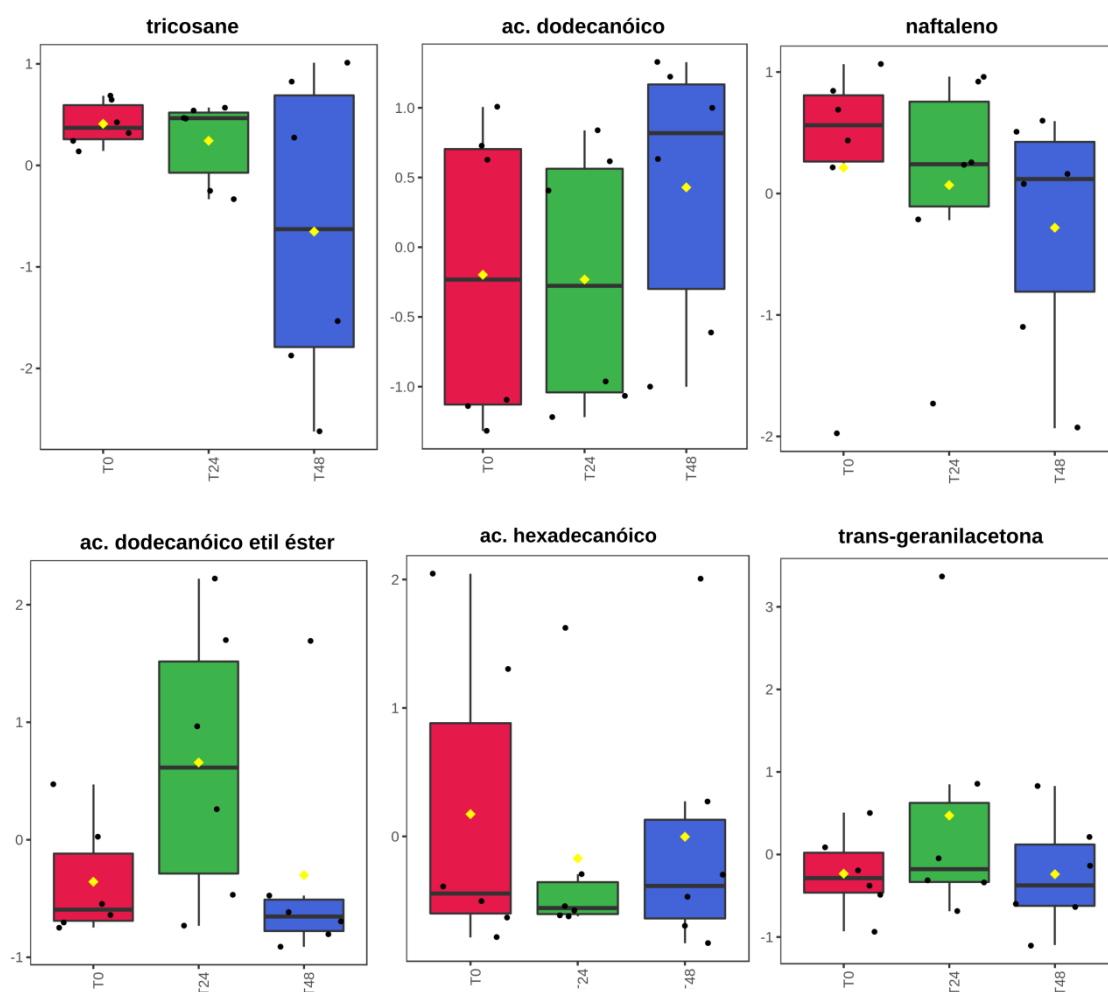


Figura 5. Boxplot obtido a partir da análise compostos mais abundantes na análise de pupas mortas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, associada técnicas de perfuração utilizando alfinete entomológico e congelamento em nitrogênio líquido e em freezer. O eixo Y representa as intensidades normalizadas dos compostos como quartil para cada grupo de amostra. O intervalo da escala vertical é do valor mínimo ao máximo do grupo selecionado, ou, o maior ou o menor dos pontos de referência exibidos, mediana e intervalo de confiança de 95 %.

Os compostos de pupas e larvas associados aos tempos são distintos, tendo em comum apenas o ácido dodecanóico e ácido dodecanoico etil éster, mas com distribuições diferentes ao longo do tempo. Para larvas, a distribuição dos dois compostos foi mais intensa no tempo inicial (T0) e menor nos tempos T24 e T48, enquanto para pupas a maior abundância foi no T24 ou T48.

Experimento comportamental

A análise estatística para o teste de CH revelou diferença significativa entre as técnicas ($p = 0,0532$), fases das crias ($p = 0,0058$) e tempo de avaliação do comportamento higiênico ($p = 0,0030$).

As interações entre os parâmetros foram significativas entre técnicas *versus* tempo ($p = 0,0004$) e fase *versus* tempo ($p = 0,0002$), e não significativa entre técnica *versus* fase, e interação dos três fatores. O desdobramento das interações significativas foi analisado no teste Tukey e mostrou que entre técnica *versus* tempo (Tabela 1), em 24 e 48 horas a técnica NIL difere de FRZ e difere de PER em 24 horas. Considerando os tempos dentro de cada técnica, aqui correspondentes às colunas, apenas a técnica NIL difere. Para as demais técnicas a média de remoção é praticamente igual.

Tabela 1. Interação entre o tempo de remoção de crias e as técnicas de perfuração com alfinete entomológico (PER), congelamento em freezer (FRZ) e congelamento em nitrogênio líquido (NIL) utilizadas em estudo do comportamento higiênico em abelhas

TEMPO	TÉCNICAS		
	PER	FRZ	NIL
24	2,07 bA	2,50 bA	4,57 aA
48	1,46 abA	3,00 aA	1,25 bB

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Analisando a interação entre fases da cria e tempo (Tabela 2), a remoção de larva e pupa diferiu no tempo de 24 horas. Em valores percentuais, a remoção

de larva independente da técnica em 24 horas foi de 75,6 % e de pupas apenas 31,9 %.

Tabela 2. Interação entre as fases da cria (pupa e larva) e o tempo de remoção de crias mortas por meio de técnicas de perfuração com alfinete entomológico, congelamento em freezer e congelamento em nitrogênio líquido

TEMPO	FASES DE DESENVOLVIMENTO	
	PUPA	LARVA
24	1.81 bA	4.29 aA
48	2.10 aA	1.71 aB

Médias seguidas com a mesma letra minúsculas nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância.

Comparando apenas a remoção de larvas entre os tempos, os valores também diferem, uma vez que grande parte da remoção ocorreu em 24 horas, e restaram poucas larvas para serem removidas em 48 horas.

Discussão

Os compostos identificados neste estudo revelam a diversidade química em crias de *M. quadrifasciata anthidioides* e a diferença entre os métodos mais utilizados em testes de comportamento higiênico. Esses compostos são, possivelmente, semioquímicos utilizados na comunicação dessa espécie, uma vez que foram relatados com essa função em outras espécies de ASF desencadeando diversos tipos de comportamento (CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2007; PATRICIO *et al.*, 2003; PIANARO *et al.*, 2009; NDUNGU *et al.*, 2018). Mas, especificamente sobre os compostos relacionados ao CH nas abelhas sem ferrão, ainda não há estudos. Portanto, os resultados obtidos serão comparados com estudos relacionados ao CH das abelhas do gênero *Apis*.

Perfil de compostos voláteis de larvas e pupas

Nesse estudo, foram investigados em larvas e pupas mortas os perfis de COV's para cada idade, uma vez que em estudo anterior foi verificada uma "preferência" na remoção de larvas no teste de CH (JESUS *et al.*, 2017). Nas abelhas sem ferrão há possibilidade de testar o CH em larvas porque as células de cria começam a ser operculadas logo após a postura da rainha, diferente das *Apis*, nas quais as células são operculadas já na fase pré-pupa (entre o 10 e 12º dia).

Realizada a análise discriminante de larvas e pupas foi verificada a separação dos perfis de compostos, o que fornece evidências para a hipótese de que existe diferença do perfil químico entre as fases de cria. Outros estudos deverão ser realizados para investigar se é a diferença do perfil químico ou a intensidade dos compostos entre larvas e pupas que incita a remoção prioritária de larvas.

Para larvas a maioria dos compostos pertence ao grupo dos ácidos carboxílicos, álcool e cetona. Enquanto para pupa os compostos mais abundantes são hidrocarbonetos, terpenos e álcool.

Alguns dos principais compostos da separação dos perfis já foram identificados em ASF, como o ácido pentadecanoico obtido da secreção cefálica de ASF africanas, gênero *Hypotrigona* (NDUNGU *et al.*, 2018); o ácido dodecanoico e o aldeído tetradecanal, extraídos da glândula abdominal de *Plebeia droryana* e *Nannotrigona testaceicornis* (PIANARO *et al.*, 2009). O tetradecanal também foi encontrado na glândula de dufour em *Frieseomelitta silvestrii* (PATRICIO *et al.*, 2003).

As cetonas 3-hepten-2-ona e 2-nonanona foram identificadas na glândula mandibular de *Oxytrigona mediorufa Cockerell* (CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2007), e indicadas como compostos de alarme, devido a resposta agressiva no bioensaio comportamental. A 2-nonanona também foi encontrada na glândula de Dufour em rainhas de *Scaptotrigona mexicana* (GRAJALES-CONESA *et al.*, 2007) e as operárias foram atraídas pelo extrato da glândula e pela mistura sintética. Já a cetona 2-tridecanona, isolada da glândula de Dufour de *Frieseomelitta varia*

(PATRICIO *et al.*, 2003), foi identificada como componente do feromônio de alarme produzido por machos de *Scaptotrigona depilis*, ao qual as operárias respondem com luta e os machos com fuga (SCHORKOPF, 2016). A transgeranilacetona, foi identificada na glândula de Dufour de *Nannotrigona testaceicornis* (CRUZ-LÓPEZ; PATRICIO, MORGAN, 2001).

Como exposto, os compostos verificados nesse estudo nas fases de larva e pupa também foram obtidos da secreção de diferentes glândulas das abelhas adultas. A função dessas glândulas em abelhas não está claramente definida, há diferenças entre espécies e castas, mas de modo geral, as glândulas salivares cefálicas, mandibulares, glândula de Dufour e glândula de Nasonov são indicadas na produção de semioquímicos (ABDALLA *et al.*, 2004; CRUZ-LANDIM, 1967; CRUZ-LANDIM *et al.*, 2012; JARAU *et al.*, 2004). Diante dos resultados de bioensaios reportados nesses estudos, é possível fazer uma triagem dos compostos com potencial para estimular remoção das crias mortas em *M. q. anthidioides*.

Perfil de compostos voláteis de larvas versus técnicas

Com relação à análise entre as técnicas PER, NIL e FRZ utilizando dados obtidos das larvas e pupas, a separação dos perfis de cada técnica apoia nossa hipótese de que existe diferença no tipo de COV's emanados de crias mortas em razão da técnica de CH. Para a análise de larvas, a maioria dos compostos discriminantes estava em maior abundância em FRZ e menor em NIL. A esse respeito, supomos que a técnica FRZ conserva os compostos dentro das células, enquanto a NIL modifica a estrutura do opérculo, possivelmente aumentando os poros e/ou afinando a camada de cera, assim os voláteis permeiam mais facilmente para o ambiente da colônia. Essa nova hipótese precisa ser testada comparando a estrutura do opérculo antes e depois do congelamento com nitrogênio líquido e visualização da estrutura em microscópio.

Alguns dos compostos que contribuíram para a separação dos grupos entre larvas e pupas também foram importantes nessa análise, como os ácidos pentadecanoico, decanoico e dodecanoico, o aldeído tetradecanal, a cetona 2-

tridecanona, bem como a 3-hepten-2-ona, composto exclusivo da técnica PER. Esses compostos podem ter importância na comunicação, sendo possivelmente os principais compostos emanados na fase de larva. A composição volátil das larvas pode ser proveniente do feromônio de marcação de ovos da rainha liberado pela glândula de Dufour no momento da postura (OLDROYD *et al.*, 2002), das secreções da glândula salivar das operárias durante a manipulação do alimento das crias (LECONTE *et al.*, 1990), bem como das secreções da glândula salivar da própria larva (CRUZ-LANDIM, 2009). A fração não volátil ultrapassa barreira física da célula e chega à larva, que o incorpora (LECONTE *et al.*, 1990).

Para o gênero *Apis*, LeConte *et al.* (1990) descreveram como feromônio de larvas uma mistura de dez ésteres etílicos e metílicos dos ácidos oleico, linoleico, linolênico, hexadecanoico e octadecanoico. Com base na resposta biológica das abelhas a essas substâncias, foi desenvolvida uma composição sintética utilizada para manipular o comportamento e melhorar o desempenho das abelhas operárias na coleta de recursos (PANKIW; LAFONTAINE; AVELINO, 2010). O β -ocimeno também é considerado componente do feromônio das crias, que sinaliza as operárias a necessidade de alimento (MAISONNASSE *et al.*, 2010; TRAYNOR *et al.*, 2014). Nesse estudo nenhum dos compostos do feromônio foi identificado, isso pode estar relacionado à variação entre os gêneros, o que ocorre, por exemplo, com o β -ocimeno, como mencionado anteriormente, em ASF não há alimentação progressiva das crias, portanto, se o β -ocimeno não tiver outra função biológica para larvas além da sinalização de fome, realmente não aparecerá nas análises. Da mesma forma que não aparece nas análises de crias recém operculadas em *Apis* (MAISONNASSE *et al.*, 2010).

Perfil de compostos voláteis de pupas versus técnicas

Na análise das técnicas utilizando dados de pupas, os compostos mais abundantes na análise dos grupos de idade não foram importantes para discriminar os grupos, diferente do verificado para larvas. Aqui, o principal

composto discriminante, ácido hexadecanoico foi identificado na secreção cefálica de *Tetragonisca angustula* (FRANCKE *et al.*, 2000). O ácido dodecanoico etil éster foi identificado como componente cuticular de *Trigona collina* e *Trigona melina*, ASF asiáticas (LEONHARDT; BLÜTHGEN; SCHMITT, 2009). O tricosano foi avaliado como hidrocarboneto cuticular em *Melipona quadrifasciata* no estudo de Martin *et al.* (2017). Nesses estudos não foram realizados testes comportamentais para informar a função biológica desses compostos nas abelhas.

De modo geral, a maioria dos compostos estava em maior abundância em PER e menor abundância em NIL, isso reforça nossa nova hipótese sobre o efeito do nitrogênio sobre o opérculo das células de cria. Nas análises de larva e pupa, tanto a técnica PER quanto a técnica FRZ parecem preservar os compostos voláteis dentro das células, o que para PER é uma novidade, diante das discussões provocadas por essa técnica (GRAMACHO *et al.*, 1999; SPIVAK; DOWNEY, 1998).

Com relação aos compostos exclusivos, apenas o da técnica PER (fenilmetilcarbinol) contribuiu para a separação dos grupos. Esse composto já foi relatado em *Trigona spinipes*, sendo relacionado ao feromônio de alarme dessa espécie (SCHORKOPF, 2009).

A princípio era esperado que os compostos exclusivos de cada técnica apresentassem uma distribuição marcante entre os grupos, acredita-se que a baixa intensidade desses compostos na amostra tenha afetado a sua expressão na análise, no entanto, para a comunicação esses compostos podem ter importância biológica, uma vez que os insetos utilizam os compostos em proporções diminutas (nanograma) (BREZOLIN *et al.*, 2018).

Perfil de compostos voláteis de larvas e pupas versus tempos de avaliação

Essa análise revelou que, para os dados de larva, cinco dos seis compostos mais importantes apresentavam maior abundância no T0, tempo logo após a morte das crias. Para os dados de pupa, apenas três compostos estavam em maior abundância do T0 (tricosano, naftaleno e ácido hexadecanoico). Essa

análise pode indicar que no estágio inicial (T0) foram capturados os compostos realmente presentes em larvas, a partir do T24 e T48 os compostos são volatilizados e/ou sofrem degradação, além da formação de compostos provenientes da decomposição das larvas mortas.

Os compostos de pupas e larvas associados aos tempos são distintos, tendo em comum apenas o ácido dodecanoico e ácido dodecanoico etil éster, mas com distribuições diferentes ao longo do tempo. Para larvas, a distribuição dos dois compostos foi mais intensa no tempo inicial (T0) enquanto para pupas a maior abundância ocorreu no T24 ou T48. Atribuímos essa diferença às características da estrutura corporal de cada fase, sendo que para pupas a estrutura por ser mais complexa, esclerotizada (CRUZ-LANDIM, 2009), pode dificultar a volatilização dos compostos. Assim, cada composto se comportou de maneira diferente ao longo do tempo gerando acúmulo dos compostos nos tempos finais da avaliação.

Dentre os compostos discriminantes nesse estudo, o 2-tridecanona apareceu em todas as análises. Outro composto que recebe destaque é o trans-geranilacetona, seguido do ácido dodecanoico e ácido dodecanoico etil éster. Os compostos 2-tridecanona, trans-geranilacetona e ácido dodecanoico estão em maior abundância em larva na análise entre fases, já o ácido dodecanoico etil éster não aparece nessa análise.

Na análise das técnicas, 2-tridecanona, ácido dodecanoico e ácido dodecanoico etil éster estão com distribuição semelhante, com relação a trans-geranilacetona, aparece apenas na análise de pupas *versus* técnicas. Essa triagem pode ser útil para os desdobramentos dessa pesquisa, como a realização de testes eletroantagráficos e bioensaios comportamentais com os compostos bioativos.

Compostos não discriminantes na análise estatística e sua função no CH

Os compostos que não foram discriminantes para a análise estatística dos perfis podem ser importantes na comunicação das abelhas durante a remoção das crias mortas, desse modo, indicamos a função química desses compostos

nos diferentes grupos de insetos, mas direcionando as pesquisas para Hymenoptera e mais especificamente abelhas, quando possível.

Buscou-se na literatura compostos relacionados ao CH em abelhas do gênero *Apis*. Alguns compostos foram identificados em crias saudáveis, mortas experimentalmente, crias infestadas com *Varroa destructor* ou contaminadas com fungos, assim, os resultados apresentam compostos emanados da cria e produto da infestação ou infecção pelo agente patogênico. Esses estudos indicam compostos candidatos ao CH provenientes das análises químicas, outros por meio de bioensaios, indicam os compostos bioativos às abelhas em testes eletroantegráficos ou no momento da remoção. A diversidade dos compostos relatados é grande, com representantes de grupos funcionais como: álcool, hidrocarbonetos (alcenos, alcanos), cetona, éster e terpeno.

O 2-feniletanol, álcool benzílico e o acetato de fenetil, foram encontrados em crias contaminadas por *Ascosphaera apis* (SWANSON *et al.*, 2009), sendo o 2-feniletanol considerado composto chave para o comportamento higiênico em *A. mellifera*. No presente estudo foi verificada a presença desse composto em crias mortas experimentalmente, sem sintomas de infecção. Lee *et al.* (2020), identificaram ácido propiônico, ácido valérico, 2-nonanona em larvas de *Apis mellifera* infectadas com *Paenibacillus larvae*, esses compostos foram detectados por abelhas higiênicas em teste eletroantegráfico.

Nazzi, Della Vedova e D'agaro (2004), identificaram em crias infestadas por *Varroa destructor* três alcenos: (Z)-6-pentadeceno; (Z)-7-pentadeceno; (Z)-8-heptadeceno e um alcano, o pentadecano. E mostraram que (Z) -6-pentadeceno induziu o comportamento higiênico. Wagoner *et al.* (2021) mostraram que a partir de crias infestadas, a mistura dos compostos (Z) -10-tritriaconteno, (Z) -8-hentriaconteno, (Z) -8-heptadeceno e (Z) -6-pentadeceno estimulou o CH em um ensaio de campo. O hexanoato de etila e α -pineno, também estavam presentes em pupas infestadas por ácaros, e ausentes em pupas não infestadas, em teste de campo esses compostos mostraram-se relevantes para remoção das crias (LIENDO *et al.*, 2021). Esses autores também encontraram naftaleno e heptadecano, compostos identificados em nosso estudo.

Outros compostos como tricosan-2-ona, pentacosan-2-ona, acetato de tetracosil, heptacosan-2-ona, acetato de hexacosil e nonacosan-2-ona, compostos específicos de ácaro também desencadearam o CH (MONDET *et al.*, 2021).

O ácido oleico e β -ocimeno, foram identificados em crias mortas por congelamento e foi relatado que associados, esses compostos sinalizam a morte da cria, desencadeando a remoção (MCAFEE *et al.*, 2017; MCAFEE *et al.*, 2018). Esses autores também identificaram o heneicosano, hidrocarboneto encontrado em nosso estudo, no entanto, não foi composto discriminante nas análises. A detecção de hidrocarbonetos nos experimentos de *headspace* pode indicar que a partir deles, os indivíduos possam reconhecer companheiros de ninho sem contato direto (SCHMITT *et al.*, 2007).

A partir das informações obtidas na literatura sobre os compostos químicos identificados nesse trabalho, nota-se uma multifunção das substâncias na comunicação das abelhas (ALAUX; MAISONNASSE; LECONTE, 2010), com variação entre as espécies e castas. Nesse estudo nenhum dos compostos descritos como estímulo para CH em *Apis* foi identificado. Isso pode estar relacionado à técnica de extração utilizada, as condições de extração, o tipo de fibra utilizada no SPME e a coluna cromatográfica utilizada no GC. Além disso, pode haver variação dos compostos emanados entre crias de *Apis* e ASF. Para identificar os compostos que estimulam o CH em ASF deverão ser realizados estudos eletrofisiológicos e bioensaios comportamentais.

Experimento comportamental

Os resultados do experimento comportamental refutam a hipótese de que operárias removem crias mortas por perfuração mais rápido quando comparadas às técnicas de congelamento, já que verificamos maior remoção em NIL. De modo geral, grande parte dos compostos discriminantes nas análises químicas estava em maior abundância em FRZ, abundância intermediária em PER e menor abundância em NIL, neste sentido, o estímulo para remoção pode não ser a alta intensidade dos compostos, mas a variação da intensidade normal de

compostos emanados entre cria viva e morta (KATHE *et al.*, 2021; SUN; ZHOU, 2013). Os compostos específicos para NIL identificados nesse estudo também devem ser investigados.

Os dados comportamentais fornecem evidências para nossa hipótese de que larvas são removidas mais rapidamente do que pupas, independente da técnica utilizada. Com base nas observações durante manejo das colônias seria esperado que as operárias removessem mais rapidamente as pupas do que as larvas, já que na fase de larvas existe uma maior quantidade de cerume (cera e resina) no opérculo, em pupas as abelhas operárias iniciam a raspagem desse material tornando-o mais fino, para facilitar a emergência do adulto (NOGUEIRA-NETO, 1997). A maior quantidade de cera e resinas nas células de larvas poderia dificultar a detecção das larvas mortas pelas operárias. No entanto, a remoção preferencial de larvas em detrimento de pupas pode estar relacionada aos compostos discriminantes na análise química das fases. Essa hipótese deve ser testada em bioensaios utilizando os compostos ou a mistura deles nas colônias.

A detecção precoce de larvas mortas pode melhorar a saúde da colônia, uma vez que as crias são operculadas ainda na fase de ovo, momento em que o contaminante terá acesso à célula, possivelmente através do alimento provido pelas operárias. Nesse sentido, é importante investigar os estímulos para a remoção de larvas de modo que conseguirá eliminar o agente patogênico na fase inicial, evitando a disseminação em toda a colônia. De acordo com Al Toufailia *et al.* (2016), nos meliponíneos os baixos índices de doença registrados, devem-se aos eficientes mecanismos de controle, dentre eles o CH.

Os COV'S identificados neste estudo revelam a diversidade química em *M. quadrifasciata anthidioides* e a variação dos perfis de compostos, mostrando que a escolha do método modifica o perfil de voláteis e as abelhas percebem e executam a remoção mais rápida ou lentamente em cada técnica. E que o método de perfuração não estimula maior remoção devido ao dano no opérculo, uma vez que a remoção das crias mortas por nitrogênio líquido foi mais rápida.

Se a previsão de maior volatilização em NIL devido às alterações no opérculo se confirmar, os compostos mais abundantes na análise entre as idades que apareceram como menos abundantes em NIL na análise de larvas *versus*

as técnicas deverão ser avaliados nos próximos estudos, são eles: 2-tridecanona e tetradecanal. Em outra abordagem, comparando os compostos menos abundantes na fase de larva, o 2-heptanol, segue em menor abundância na análise de larvas *versus* técnicas na técnica NIL. Outra hipótese possível é que os compostos mais abundantes em larva na análise de fases (ácido pentadecanoico, ácido dodecanoico, 2-tridecanona e tetradecanal) podem incitar a remoção primeiro.

Com base nos resultados desse estudo, os compostos indicados merecem ser estudados em detalhe em bioensaios, com vistas à remoção de crias.

Conclusões

Neste estudo foi demonstrado que tanto a técnica utilizada para avaliar o CH das colônias quanto o estágio de desenvolvimento da cria exibem perfis químicos diferentes, que podem influenciar na remoção da cria e conseqüentemente na classificação da colônia como higiênica ou não higiênica. A técnica de perfuração de crias não antecipou a remoção quando comparada com as demais técnicas. Os compostos identificados neste estudo podem ser testados quanto a eficiência de remoção de crias em testes comportamentais em abelhas. Além disso, os compostos aqui identificados contribuem para o conhecimento dos compostos voláteis de *M. quadrifasciata anthidioides*.

Referências bibliográficas

ALAUX, C.; MAISONNASSE, A.; LE CONTE, Y. Pheromones in a superorganism: from gene to social regulation. *In*: LITWACK, G. (ed). **Pheromones**, [S.l.], v. 83, p. 40-423, 2010. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(10\)83017-1](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(10)83017-1)

ABDALLA, F. C.; JONES, G. R.; MORGAN, E. D.; CRUZ-LANDIM, C. Chemical composition of the Dufour gland secretion in queens of *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Meliponini). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 15, n. 4, p. 621-625, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000500002>

AL TOUFAILIA, H.; ALVES, D. A.; BENTO, J. M.; MARCHINI, L. C.; RATNIEKS, F. L. Hygienic behaviour in Brazilian stingless bees. **Biology Open**, [S.l.], v. 5, n. 11, p. 1712-1718, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1242/bio.018549>

- BIGIO, G.; SCHÜRCH, R.; RATNIEKS, F. L. W. Hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera: Apidae): effects of brood, food, and time of the year. **Journal of Economic Entomology**, [S.l.], v. 106, n. 6, p. 2280-2285, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1603/EC13076>
- BREZOLIN, A. N.; MARTINAZZO, J.; MUENCHEN, D. K.; CEZARO, A. M. DE; RIGO, A. A.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; BLASSIOLI-MORAES, M. C.; BORGES, M. Tools for detecting insect semiochemicals: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 410, n. 17, p. 4091-4108, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1118-3>
- CRUZ-LANDIM, C. da. Estudo comparativo de algumas glândulas das abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. **Arquivos de Zoologia**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 177-290, 1967.
- CRUZ-LANDIM, C. da. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009. 408 p. DOI: <https://doi.org/10.7476/9788539304301>
- CRUZ-LANDIM, C. da; FERREIRA-CALIMAN, M. J.; GRACIOLI-VITTI, L. F.; ZUCCHI, R. Correlation between mandibular gland secretion and cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **Genetics and Molecular Research**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. gmr1362, 2012. DOI: <https://doi.org/10.4238/2012.April.19.2>
- CRUZ-LÓPEZ, L.; AGUILAR, S.; MALO, E. A.; RINCÓN, M.; GUZMAN, M.; AND ROJAS, J. C. Electroantennogram and behavioral responses of workers of the stingless bee *Oxytrigona mediorufa* to mandibular gland volatiles. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, [S. l.], v. 123, p. 43-47, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2007.00522.x>
- CRUZ-LÓPEZ, L.; PATRICIO, E. F. L. R. A.; MORGAN, E. D. Secretions of stingless bees: the Dufour gland of *Nannotrigona testaceicornis*. **Journal of Chemical Ecology**, [S. l.], v. 27, p. 69-80, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1005667916765>
- FRANCKE, W.; LÜBKE, G.; SCHRÖDER, W.; RECKZIEGEL, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; KLEINERT, A.; ENGELS, E.; HARTFELDER, K.; RADTKE, R.; ENGELS, W. Identification of oxygen containing volatiles in cephalic secretions of workers of Brazilian stingless bees. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 11, p. 562-571, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532000000600003>
- GRAJALES-CONESA, J.; ROJAS, J. C.; GUZMÁN-DÍAZ, M.; RINCÓN-RABANALES, M.; CRUZ-LÓPEZ, L. Cephalic and Dufour gland secretions of *Scaptotrigona mexicana* queens: chemical composition and biological activity. **Apidologie**, [Paris], v. 38, p. 38-46, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2006052>
- GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Estudo Comparativo dos Métodos de Congelamento e Perfuração de Crias para Avaliação do Comportamento Higiênico em Abelhas Africanizadas. *In*: IV Congresso Ibero-latinoamericano de Apicultura. **Anais [...]**, Rio Cuarto - Córdoba, 45, 1994.
- GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S.; ROSENKRANZ, P.; DE JONG, D. Influence of body fluid from pin-killed honey bee pupae on hygienic behavior. **Apidologie**, Paris, v. 30, n.5, p. 367-374, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:19990502>
- JARAU, S.; HANCIR, M.; ZUCCHI, R.; BARTH, F. G. A Stingless Bee use labial gland secretion for scent trail communication (*Trigona recursa* Smith, 1863). **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, [S. l.], v. 190, n. 3, p. 233-239, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00359-003-0489-9>
- JESUS, J. N.; CHAMBÓ, E. D.; DA SILVA SODRÉ, G.; DE OLIVEIRA, N. T. E.; DE CARVALHO, C. A. L. Hygienic behavior in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini). **Apidologie**, [Paris], v. 48, n. 4, p.504-512, 2017. DOI: [10.1007/s13592-017-0495-5](https://doi.org/10.1007/s13592-017-0495-5)

KATHE, E.; SEIDELMANN, K.; LEWKOWSKI, O.; LE CONTE, Y.; ERLER, S. Changes in chemical cues of *Melissococcus plutonius* infected honey bee larvae. **Chemoecology**, [S. l.], v. 31, p. 189-200, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00049-021-00339-3>

LECLERCQ, G.; FRANCIS, F.; GENGLER, N.; BLACQUIÈRE, T. Bioassays to quantify hygienic behavior in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies: a review. **Journal of Apicultural Research**, [S. l.], v. 57, n. 5, p. 663-673, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1494916>

LECONTE, Y.; ARNOLD, G.; TROUILLER, J.; MASSON, C. Identification of a brood pheromone in honeybees. **Naturwissenschaften**, [S. l.], v. 77, p. 334-336, 1990. DOI: [10.1007/BF01138390](https://doi.org/10.1007/BF01138390)

LEE, S.; LIM, S.; CHOI, Y. S.; LEE, M.; KWON, H. W. Volatile disease markers of American foulbrood-infected larvae in *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 122, p. 104040, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104040>

LEONHARDT, S. D.; BLÜTHGEN, E. N.; SCHMITT, E. T. Smelling like resin: terpenoids account for species-specific cuticular profiles in Southeast-Asian stingless bees. **Insectes Sociaux**, [S. l.], v. 56, p. 157-170, 2009. DOI: [10.1007/s00040-009-0007-3](https://doi.org/10.1007/s00040-009-0007-3)

LIENDO, M. C.; MUNTAABSKI, I.; RUSSO, R. M.; LANZAVECCHIA, S. B.; SEGURA, D. F.; PALACIO, M. A.; CLADERA, J. L.; FERNÁNDEZ, P. C.; SCANNAPIECO, A. C. Temporal changes in volatile profiles of *Varroa destructor* infested brood may trigger hygienic behavior in *Apis mellifera*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, [S. l.], v. 169, n. 6, p. 563-574, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/eea.13048>

MAISONNASSE, A.; LENOIR, J. C.; BESLAY, D.; CRAUSER, D.; LE CONTE, Y. E- β -ocimene, a volatile brood pheromone involved in social regulation in the honey bee colony (*Apis mellifera*). **PLOS one**, [S. l.], v.5, n. 10, p. e13531, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013531>

MARTIN, S. J.; SHEMILT, S.; LIMA, C. B. da S.; CARVALHO, C.A.L de. Are isomeric alkenes used in species recognition among neo-tropical stingless bees (*Melipona* spp). **Journal of Chemical Ecology**, [S. l.], v. 43, p. 1066-1072, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0901-5>

MCAFEE, A.; CHAPMAN, A.; IOVINELLA, I.; GALLAGHER-KURTZKE, Y.; COLLINS, T. F.; HIGO, H.; MADILAO, L. L.; PELOSI, P.; FOSTER, L. J. A death pheromone, oleic acid, triggers hygienic behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 5719, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24054-2>

MCAFEE, A.; COLLINS, T. F.; MADILAO, L. L.; FOSTER, L. J. Odorant cues linked to social immunity induce lateralized antenna stimulation in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, p. 46171, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep46171>

MONDET, F., BLANCHARD, S., BARTHES, N., BESLAY, D., BORDIER, C., COSTAGLIOLA, G., HERVÉ, M. R.; LAPEYRE, B.; KIM, S. H.; BASSO, B.; MERCER, A. R.; LE CONTE, Y. Chemical detection triggers honey bee defense against a destructive parasitic threat. **Nature Chemical Biology**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 524-530, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00720-3>

NAZZI, F.; DELLA VEDOVA, G.; D'AGARO, M. A semiochemical from brood cells infested by *Varroa destructor* triggers hygienic behaviour in *Apis mellifera*. **Apidologie**, [Paris], v. 35, p. 65-70, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2003065>

NDUNGU, N. N.; KIATOKO, N.; MASIGA, D. K.; RAINA, S. K.; PIRK, C. W. W.; YUSUF, A. A. Compounds extracted from heads of African stingless bees (*Hypotrigena* species) as a

prospective taxonomic tool. **Chemoecology**, [S. I.], v. 28, p. 51-60, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00049-018-0256-6>

NEWTON D. C.; OSTASIEWSKI, N. J. J. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees. **American Bee Journal**, v. 126, p. 278-281, 1986.

NEWTON, D. C.; CANTEWELL, G. C.; BOURQUIN, E. P. Removal of freeze-killed brood as an index of nest cleaning behavior in honeybee colonies (*Apis mellifera* L.). **American Bee Journal**, [S. I.], v. 115, n. 1, p. 388-406, 1975.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997. 445 p.

OLDROYD, B. P.; RATNIEKS, F. L. W.; WOSSLER, T. C. Egg-marking pheromones in honeybees *Apis mellifera*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, [S. I.], v. 51, p. 590-591, 2002. DOI: 10.1007/s00265-002-0480-4

PANKIW, T.; LAFONTAINE, J. P.; AVELINO, N. **Stabilized brood pheromone for manipulating the behavior and physiology of honey bees**. Titular: Contech Enterprises Inc., Victoria, BC (CA). US Patent No. 7,727,517. Depósito: 7 set. 2006. Concessão: 1 jun. 2010. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US7727517B2/>

PATRICIO, E. F. L. R. A.; CRUZ-LOPEZ, L.; MAILE, R.; MORGAN, E. D. Secretions of stingless bees: the Dufour glands of some *Frieseomelitta* species (Apidae, Meliponinae). **Apidologie**, [Paris], v. 34, p. 359-365, 2003. DOI: 10.1051/apido:2003027

PIANARO, A.; MENEZES, C.; KERR, W. E.; SINGER, R. B.; PATRICIO, E. F. L. R. A.; MARSALOLI, A. J. Stingless bees: chemical differences and potential functions in *Nannotrigona testaceicornis* and *Plebeia droryana* males and workers. **Journal of Chemical Ecology**, [S. I.], v. 35, n. 9, p. 1117-1128, 2009. DOI:10.1007/s10886-009-9679-4

PIRES, S.; JOSA, A.; MARTINS, A.; COSTA, A. Estudo de alguns métodos usados para avaliar o comportamento higiênico de ecotipos locais de abelhas Portuguesas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, [S. I.], v.101, n. 557-558, p. 45-49, 2006.

SCHMITT, T.; HERZNER, G.; WECKERLE, B.; SCHREIER, P.; STROHM, E. Volatiles of foraging honeybees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) and their potential role as semiochemicals. **Apidologie**, [Paris], v.38, n.2, p. 164-170, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2006067>

SCHORKOPF, D. L. P. Male meliponine bees (*Scaptotrigona* aff. *depilis*) produce alarm pheromones to which workers respond with fight and males with flight. **Journal of Comparative Physiology A**, [S. I.], v. 202, p. 667-678, 2016. DOI: 10.1007/s00359-016-1109-9

SCHORKOPF, D. L. P.; HRNCIR, M.; MATEUS, S.; ZUCCHI, R.; SCHMIDT, V.M.; BARTH, F. G. Mandibular gland secretions of meliponine worker bees: further evidence for their role in interspecific and intraspecific defence and aggression and against their role in food source signalling. **Journal of Experimental Biology**, [S. I.], v. 212, n. 8, p. 1153-1162, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.021113>

SPIVAK, M., DANKA, R. G. Perspectives on hygienic behavior in *Apis mellifera* and other social insects. **Apidologie**, [Paris], v. 52, p. 1-16, 2021. DOI: 10.1007/s13592-020-00784-z

SPIVAK, M.; DOWNEY, D. L. Field assays for hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, [S. I.], v. 91, p. 64-70, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/91.1.64>

SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. **Apidologie**, [Paris], v. 29, n.3, p. 291-302, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:19980308>

SUN, Q.; ZHOU, X. Corpse management in social insects. **International journal of biological sciences**, [S. I.], v. 9, n. 3, p. 313–321, 2013. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijbs.5781>

SWANSON, J. A. I.; TORTO, B.; KELLS, S. A.; MESCE, K. A.; TUMLINSON, J. H.; SPIVAK, M. Odorants that induce hygienic behavior in honeybees: identification of volatile compounds in chalkbrood-infected honeybee larvae. **Journal of Chemical Ecology**, [S. I.], v. 35, n. 9, p. 1108-1116, 2009. DOI: 10.1007/s10886-009-9683-8

TRAYNOR, K. S.; LE CONTE, Y.; PAGE, R. E. Queen and young larval pheromones impact nursing and reproductive physiology of honey bee (*Apis mellifera*) workers. **Behavioral ecology and sociobiology**, [S. I.], v. 68, n. 12, p. 2059-2073, 2014. DOI: 10.1007/s00265-014-1811-y

WAGONER, K.; MILLAR, J G; KELLER, J; BELLO, J.; WAIKER, P; SCHAL, C.; SPIVAK, M; RUEPPELL, O. Hygiene-Eliciting Brood Semiochemicals as a Tool for Assaying Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Resistance to *Varroa* (Mesostigmata: Varroidae). **Journal of Insect Science**, [S. I.], v. 21, n. 6, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab064>

WILSON-RICH, N.; SPIVAK, M.; FEFFERMAN, N. H.; STARKS, P. T. Genetic, Individual and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. **Annual Review of Entomology**, [S. I.], v. 54, n. 1, p. 405-423, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093301>

ZHAO, H.; LIANG, Q.; LEE, J.; ZHANG, X.; HUANG, W.; CHENG, H.; LUO, Y. Behavioral Responses of *Apis mellifera*. Adult Workers to Odors from Healthy Brood and Diseased Brood. **Sociobiology**, [S. I.], v. 62, n. 4, p. 564-570, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v62i4.392>

ARTIGO III**RESPOSTA ELETROANTENOGRÁFICA DE *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEPELETIER, 1836 (APIDAE, MELIPONINAE) AOS VOLÁTEIS DE LARVAS MORTAS²**

² Artigo será reajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico *Journal of Chemical Ecology* em versão na língua inglesa.

RESPOSTA ELETROANTENOGRÁFICA DE *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEPELETIER, 1836 (APIDAE, MELIPONINAE) AOS VOLÁTEIS DE LARVAS MORTAS

Resumo:

O comportamento higiênico (CH) é um mecanismo de imunidade em abelhas, que proporciona a tática de defesa natural contra distintas doenças, através da capacidade de localização e remoção de crias mortas e/ou doentes, melhorando a sanidade e produtividade das colônias. Investigações de respostas eletrofisiológicas de operárias de ascendência higiênica ao extrato de larvas mortas, foram realizadas para identificar compostos voláteis candidatos ao comportamento higiênico em abelhas sem ferrão. As amostras congeladas de cria na fase de larva foram obtidas a partir do congelamento em nitrogênio líquido e posteriormente submetidas à coleta de voláteis por areação durante 24 horas, para obtenção dos extratos. O perfil químico foi avaliado por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). A análise química por CG-EM indicou a presença de um total de 18 compostos pertencentes aos seguintes grupos químicos: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e ácido carboxílico. As respostas eletrofisiológicas foram obtidas por análise em cromatografia gasosa com detector em chamas acoplada a eletroanténografo (CG-EAG), fazendo uso da antena como detector biológico frente o extrato de voláteis. O eletroanténograma indicou que as antenas das abelhas responderam em maior número de repetições para um composto no extrato natural, que foi sugerido por CG-EM como 1-hexanol. Esse composto é candidato a incitar o comportamento higiênico em *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Para confirmação da função desse composto, serão utilizados testes de olfatométrica e bioensaios em campo utilizando o composto individual e misturas com outros compostos presentes no extrato em diferentes concentrações.

Palavras chaves: Abelha sem ferrão; Compostos voláteis; Comunicação química; Comportamento higiênico; Eletroanténografia

ELECTROANTENOGRAPHIC RESPONSE OF *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEPELETIER, 1836 (APIDAE, MELIPONINAE) TO DEAD LARVAE VOLATILES

Abstract: Hygienic behavior is an immunity mechanism in bees, which provides a natural defense tactic against different diseases through the ability to locate and remove dead or sick broods, improving the sanity and productivity of colonies. Investigations of electrophysiological responses to dead larvae extract from workers of hygienic parentage were performed to identify volatile compounds for hygienic behavior in stingless bees. We acquired frozen brood samples in the larval stage from freezing in liquid nitrogen and subsequently submitted them to the collection of volatiles by aeration for 24 hours to obtain the extracts. The chemical profile was evaluated by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Chemical analysis by GC-MS indicated the presence of 18 compounds belonging to the following chemical groups: hydrocarbons, alcohols, aldehydes, ketones, esters, and carboxylic acid. The electrophysiological responses were acquired by analysis in gas chromatography with a flame detector coupled to an electroantennograph (GC-EAG), using the antenna as a biological detector against the volatile extract. Electroantennogram indicated that bee antennae responded to a compound in the natural extract. GC-MS suggested this compound as 1-hexanol. This compound may incite hygienic behavior in *Melipona quadrifasciata anthidioides*. To verify the compound function, olfactometry tests and field bioassays will use the individual substance and mixtures with other compounds present in the extract at different concentrations.

Keywords: Stingless bee; Volatile compounds; Chemical communication; Hygienic behavior; electroantennography

Introdução

Os insetos interagem com o ambiente e outros organismos por meio de eficientes mecanismos de comunicação, indispensáveis para sua sobrevivência e reprodução (RUBENSTEIN; ALCOCK, 2018). Os estímulos utilizados na comunicação podem ser de natureza física como sinais visuais, táteis e vibracionais, e possivelmente os mais importantes, os sinais de natureza química. A comunicação química é caracterizada pela emissão de compostos orgânicos voláteis (COV's) que desencadeiam reações nos organismos que recebem o sinal (LAW; REGNIER, 1971). Esses compostos são classificados como feromônios quando a comunicação se dá entre indivíduos da mesma espécie (KARLSON; BUTENANDT, 1959) e aleloquímicos entre indivíduos de espécies diferentes (BROWN; EISNER; WHITTAKER, 1970).

A comunicação ocorre quando os compostos são captados por células especializadas em percepção sensorial, as sensilas, encontradas principalmente nas antenas dos insetos (CRUZ-LANDIM, 2009). Essas sensilas contêm no seu interior a linfa sensilar, onde são secretadas as “proteínas ligadoras de odorantes” (OBPs - Odorant Binding Proteins), que transportam os compostos voláteis até os Neurônios Sensoriais Olfativos, estes por sua vez são responsáveis por processar as informações em função do tipo de sinal recebido e desencadear um comportamento de resposta nos insetos (CHEN; ZHAO; KANG, 2003; YAN *et al.*, 2020).

Para os insetos sociais, a eficiência na comunicação é bastante desafiadora em razão da divisão em castas, com indivíduos anatômica e biologicamente distintos, o que exige sincronia para desempenho das atividades. Além disso, a sobreposição de gerações na colônia a torna mais suscetível a doenças, parasitas e contaminações diversas (SWANSON *et al.*, 2009). Ao longo da evolução as abelhas desenvolveram um tipo de controle biológico contra organismos patogênicos e contaminantes dentro da colônia, o comportamento higiênico (CH). Esse é um comportamento de base genética (BIGIO; SCHÜRCH; RATNIEKS, 2013), no qual as abelhas operárias aptas identificam compostos voláteis emitidos das crias mortas ou doentes e procedem a sua remoção,

eliminando o foco de infecção da colônia (WILSON-RICH *et al.*, 2009; BIGIO; SCHÜRCH; RATNIEKS, 2013).

É possível identificar colônias higiênicas e não higiênicas a partir das técnicas de indução de morte de crias na colônia (revisado por LECLERCQ *et al.* 2018). No entanto, não é garantido que essas colônias testadas e classificadas experimentalmente como higiênicas sejam eficientes em remover crias doentes na colônia (GILLIAN *et al.*, 1983), sendo recomendado expor as colônias aos potenciais patógenos e verificar o real CH. Mas, essa estratégia não é fácil de ser controlada, e pode facilitar a disseminação do patógeno no ambiente, além de provocar a morte de toda a colônia (SPIVAK; DANKA, 2021).

Nesse contexto, é importante conhecer os compostos envolvidos no comportamento de remoção de crias mortas, tanto em testes de CH, quanto em crias mortas por patógenos e utilizá-los para simular uma real infestação ou doença nas crias. Alguns compostos identificados em crias mortas de abelhas do gênero *Apis* são relacionados ao CH, como o ácido oleico que associado ao β -ocimeno sinaliza a morte da cria, desencadeando a remoção (MCAFEE *et al.*, 2018), o 2- fenil- etanol, álcool benzílico e o acetato de fenetil, identificados em crias contaminadas por *Ascospaera apis* (SWANSON *et al.*, 2009), o (Z) -6-pentadeceno, (Z) -10-tritriaconteno, tricosan-2-ona, pentacosan-2-ona, acetato de tetracosil, heptacosan-2-ona, acetato de hexacosil e nonacosan-2-ona, identificados em crias parasitadas pelo *Varroa destructor* (MONDET *et al.*, 2021; NAZZI; DELLA VEDOVA; D'AGARO, 2004; WAGONER *et al.*, 2020).

Para as abelhas sem ferrão (ASF), os compostos relacionados ao CH permanecem desconhecidos. Além disso, a identidade dos compostos identificados em abelhas do gênero *Apis* varia entre os estudos, assim não é possível extrapolar os resultados de *Apis* para ASF. Neste sentido, esse estudo investiga os compostos voláteis emitidos por larvas mortas que são detectados pelas antenas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, a fim de contribuir para a melhor compreensão da comunicação química relacionado ao CH em abelhas sem ferrão.

Material e Métodos

Coleta das amostras

As coletas foram realizadas em colônias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* mantidas no meliponário do Grupo de Pesquisa Insecta da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, município de Cruz das Almas, Bahia (12°39'20" W e 39°07'23" S, altitude 220 m). Um total de 25 colônias do plantel foi previamente testado quanto ao comportamento higiênico pelo método de congelamento com nitrogênio líquido (SPIVAK; REUTER, 1998; JESUS *et al.*, 2017). As colônias higiênicas foram selecionadas e serviram tanto como doadoras de discos de cria na fase de larvas quanto dos indivíduos adultos para testes eletroantenográficos.

Discos de cria na fase de larva foram selecionados e submetidos ao congelamento por nitrogênio líquido, em seguida, devolvidos às colônias durante 24 horas, protegidos do contato das operárias sendo envolvida em tecido tipo *voil*. Após esse período os discos foram armazenados em freezer a (-80 °C) até o momento da coleta dos compostos voláteis.

Os indivíduos adultos foram obtidos a partir de discos contendo crias prestes a emergir e acondicionados em gaiolas plásticas recobertas por tecido *voil*, mantidos em estufa BOD (*Biological Oxygen Demand*) sob temperatura de 27 °C ± 1 °C e umidade de 70% ± 1%, com escotofase de 24 horas. Abelhas recém-emergidas foram coletadas diariamente e mantidas em gaiolas, para controle de idade. Em cada gaiola foi oferecida dieta à base de água e xarope de sacarose. As abelhas operárias com faixa etária de 15 a 20 dias foram utilizadas nos testes de eletroantenografia.

Coleta de voláteis

Os voláteis foram coletados pelo método de aeração, no qual cada amostra (n=4) foi composta por um *pool* de 20 larvas de último instar, anteriormente mortas por congelamento em nitrogênio líquido (-196 °C). As amostras foram acondicionadas em câmaras de vidro (2 cm diâmetro x 15 cm de

altura) instaladas num sistema de aeração onde um fluxo contínuo de ar umidificado e filtrado a 0,5 L/min foi passado pelas câmaras de vidro carregando os voláteis dos insetos durante 24 horas, e retidos em 190mg do polímero adsorvente Tenax Gr/ Carbopack B (MARKES INTERNATIONAL) em tubo tipo TDU conectado a câmara de vidro.

Depois de finalizado o tempo de aeração, os compostos retidos no polímero foram eluídos com 500 µL de hexano de grau HPLC em frascos com capacidade para 1 mL. E os extratos obtidos foram concentrados a 200 µL, sob fluxo de Nitrogênio (99,95% de pureza), e mantido em freezer (-20 °C) para posterior análise química em CG-EM e CG-EAD.

Análise Química

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

Os extratos de voláteis (1µL) foram analisados em um cromatógrafo de gás acoplado a um espectrômetro de massa (Shimadzu QP2010 Plus, Kyoto, Japão) operado em modo de impacto de elétrons (70 eV), equipado com uma coluna capilar HP-5 MS (30 m, 0,25 mm id × 0,25 µm) (Agilent, Palo Alto, Califórnia, EUA), usando hélio como gás de arraste (1,0 mL min⁻¹). A análise no CG foi conduzida em modo *splitless* (280 ° C), usando as seguintes condições de programação: 50 °C por 2 min, 7 °C min⁻¹ a 110 °C, por 2 min; 7 °C min⁻¹ a 200 °C por 2 min, 10 °C min⁻¹ a 250 °C (tempo total de análise 32,43 min).

A identificação dos compostos foi realizada por análise do espectro de massa e comparação com o banco de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST08 e NIST08s). Além disso, foi obtido o índice de Kovats (IK) calculado a partir do padrão de *n*-alcanos (C7-C20), analisado em modo *Split* e sob a mesma condição de programação do CG-EM usado para o extrato de voláteis. Os IKs obtidos foram comparados com banco do Pherobase (EISAYED, 2021) e base de dados de Referência padrão do NIST (NIST, 2021).

A confirmação da identidade de alguns compostos foi realizada com padrão sintético comercial quando disponível, usando a técnica de sobreposição

dos cromatogramas das amostras (extrato de voláteis *versus* padrão sintético comercial) analisados no CG-EM.

Os padrões usados para confirmação foram heptanal (>92% de pureza, SAFC®), nonanal (95% de pureza, Sigma-Aldrich®), hexadecano (95% de pureza, Sigma-Aldrich®), heptadecano (99% de pureza, Sigma-Aldrich®).

Abundância relativa (%) dos compostos

Foram calculadas as proporções dos compostos presentes nos extratos de voláteis, baseado no cálculo da área dos picos presentes nos cromatogramas (n=4). A proporção da abundância relativa (%) obtida para cada composto no cromatograma foi apresentada em média \pm desvio padrão.

Cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia (CG-EAG)

A partir dos extratos de voláteis (4 μ l) frente a antena de abelhas operárias, foi conduzida a análise por cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia através do cromatógrafo gasoso (Shimadzu QP2010 Plus, Kyoto, Japão) acoplado ao detector eletroantegráfico (Syntech®). O CG-DIC é equipado com coluna capilar DB5-MS (5% - fenilmetilpolissiloxano, 30.0 m x 0.25 mm I.D x 0.25 μ m, RESTEK®, BELLEFONTE, USA), operado em modo *splitless* (250 °C), usando o hélio como fase móvel (1.10 mL min⁻¹). A programação da análise foi similar à descrita para o CG-EM. O efluente da coluna foi dividido numa razão 1:1, onde uma parte da amostra é direcionada ao detector de ionização em chamas (DIC) a uma temperatura de 280 °C, a outra parte seguiu para uma linha de transferência aquecida (200 °C) e com corrente de ar contínua e umidificada (0,8 L min⁻¹), mantida através de um controlador de estímulos (CS-55, Syntech™, Kirchzarten, Germany) direcionando o fluxo para antena.

A antena da abelha operária foi removida do inseto anestesiado a baixa temperatura (-20 °C) a partir do escapo, em seguida colocada entre dois capilares preenchidos com solução salina de cloreto de potássio (KCl) a 1M e conectados a eletrodos de prata (Ag) fixados em pré-amplificador de alta

impedância (IDAC-4, Syntech™) posicionado na saída do fluxo de compostos voláteis do CG (Figura 1). O eletroantenograma gerado pelo sistema de eletroantenografia acoplado ao cromatógrafo gasoso (CG-EAG) foi gravado e visualizado usando o programa AutoSpike (versão 3.9, Syntech™).

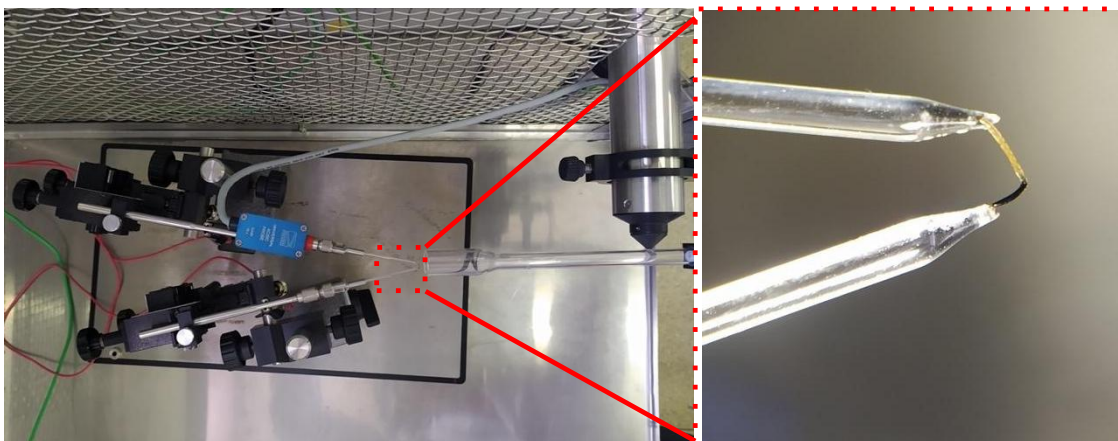


Figura 1. Antena de *Melipona quadrifasciata anthidioides* conectada entre eletrodos com capilares e posicionada na saída do fluxo de voláteis do cromatógrafo.

Resultados

Perfil dos compostos voláteis de larvas mortas

Com as análises cromatográficas foi possível caracterizar os compostos voláteis de distintos grupos químicos presentes no extrato de larvas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, mortas por congelamento em nitrogênio líquido.

Foi possível identificar a ocorrência de 18 compostos no extrato de voláteis. De acordo com as análises cromatográficas, as proporções em que os compostos estão presentes no extrato volátil foram distintas entre si. Análises da proporção dos compostos nas amostras permitem verificar a variação entre componentes do mesmo grupo. Os principais grupos químicos aos quais os compostos pertencem são hidrocarboneto ($0,2 \pm 0,19 - 5,04 \pm 2,25$); álcool ($0,01 \pm 0,15 - 3,35 \pm 3,16$); aldeído ($0,18 \pm 0,19 - 1,04 \pm 0,93$); cetona ($3,72 \pm 1,34 - 3,91 \pm 3,04$); ésteres ($0,08 \pm 0,09 - 1,09 \pm 1,28$) e ácido carboxílico ($2,25 \pm 3,26$) (Tabela 1).

Tabela 1. Compostos orgânicos voláteis (COV's) identificados em larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* mortas por congelamento em nitrogênio líquido.

PICO	COMPOSTOS	TR _{MIN}	IK _{EXP}	IK _{LIT}	ABUNDÂNCIA (%)
1	2, 4 dimetilhexano	3.234	726	729	5,04 ± 2,25
2	3-hexanona	3.676	780	775	3,91 ± 3,04
3	2-hexanona	3.736	789	789	3,72 ± 1,34
4	3-hexanol	3.818	796	797	3,35 ± 3,16
5	2-hexanol	3.894	802	803	2,58 ± 2,39
6	1-hexanol	5.053	865	865	0,01 ± 0,15
7	Vinilbenzeno	5.592	890	890	1,02 ± 0,71
8	heptanal*	5.835	900	901	0,18 ± 0,19
9	6-metil, 2-heptanol	7.051	958	960	3,16 ± 3,60
10	nonanal*	10.481	1103	1102	0,90 ± 0,61
11	Decanal	13.302	1207	1207	1,04 ± 0,93
12	9-oxononanoato de metila	19.050	1437	1436	0,23 ± 0,16
13	ácido dodecanóico	21.635	1564	1566	2,25 ± 3,26
14	hexadecano*	22.335	1599	1600	0,81 ± 0,44
15	8-heptadeceno	22.398	1689	1680	1,45 ± 0,99
16	heptadecano*	24.118	1699	1700	0,20 ± 0,19
17	tetradecanoato de metila	24.560	1726	1726	0,08 ± 0,09
18	hexadecanoato de metila	28.210	1929	1928	1,09 ± 1,28

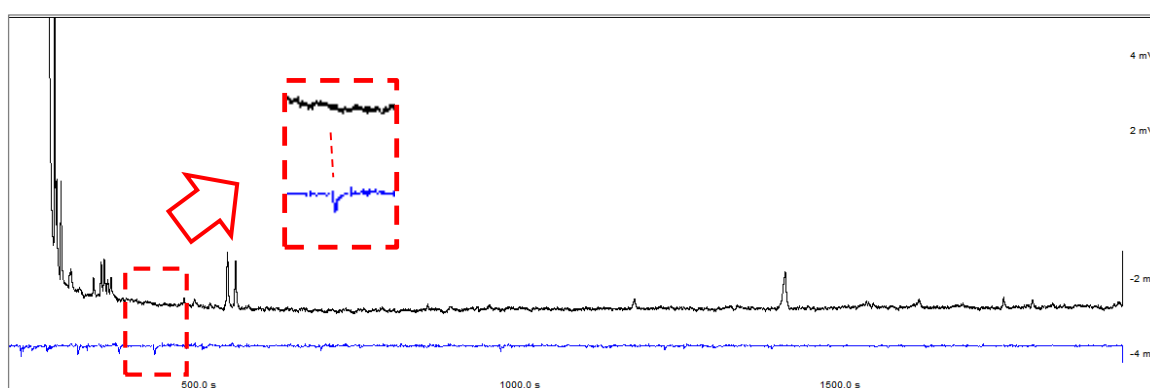
TR_{Min} = tempo de retenção do composto; IK_{Exp} = Índice de retenção obtido no experimento; IK_{Lit}= Índice de Kovats obtido na literatura; Abundância (%)= abundancia média de cada composto no extrato em valores percentuais, seguida dos valores de desvio padrão; (*) compostos confirmados com padrão sintético comercial.

No geral, foi possível observar variações nas proporções dos seis grupos funcionais, sendo que os mais abundantes foram os hidrocarbonetos (32%), seguido dos álcoois e aldeídos (21%), cetonas (10%), ésteres (11%) e ácido carboxílico (5%). Nos resultados quantitativos do extrato o grupo do hidrocarboneto possui o 2, 4 dimetilhexano (C₈H₁₈) como mais abundante, trata-se de um hidrocarboneto saturado ramificado. Os compostos presentes em maior proporção no grupo cetona, álcool e aldeído são 3-hexanona (C₆H₁₂O); 3-hexanol (C₆H₁₄O) e decanal (C₁₀H₂₀O), respectivamente. Para o grupo dos ésteres, o composto mais abundante foi o hexadecanoato de metila (C₁₇H₃₄O₂) e somente um composto pertencente ao grupo químico ácido carboxílico foi indicado na amostra, o ácido dodecanoico (C₁₂H₂₄O₂).

Composto bioativo na análise eletroantenográfica

Os extratos de voláteis anteriormente analisados por CG-EM, quando analisados no CGEAG resultaram em eletroantenogramas que evidenciaram a resposta olfativa das antenas de abelhas operárias à composição química do extrato volátil das larvas, através da indicação das despolarizações da antena simultânea a compostos presentes na amostra (Figura 2).

(A)



(B)

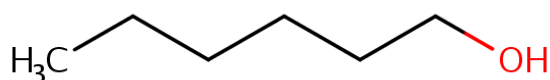


Figura 2. (A) Resposta eletrofisiológica da antena de abelhas operárias (*Melipona quadrifasciata anthidioides*) ao composto 1-hexanol (n= 4), presente em extrato hexânico obtido por meio da aeração de larvas de abelhas mortas por congelamento em nitrogênio líquido. A linha preta corresponde ao detector de ionização de chama (DIC) no CG. A linha azul corresponde à resposta antenal. (B) Estrutura química do 1-hexanol, composto que produziu resposta eletroantenográfica (FONTE: <https://comptox.epa.gov/dashboard/>).

O componente selecionado como EAG-ativo repetiu as respostas para o mesmo composto num maior número de análises por eletroantenograma. O pico foi analisado por CG-EM, indicando se tratar do 1-hexanol, pertencente ao grupo funcional álcool. A fórmula estrutural do composto é apresentada na Figura 2B.

O índice de Kovats experimental do composto que induziu as despolarizações nas antenas de abelhas operárias é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Composto do extrato de larvas mortas que provocou resposta eletrofisiológica em operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides*

Nº	Composto	Grupo funcional	IK CG-EAG	IK CG-EM	IK Lit
I	1-hexanol	Álcool	869	865	865

IK= Índice de Kovats; IK Lit= Índice de Kovats da literatura

Outras despolarizações foram observadas ao longo das análises eletroantegráficas, entretanto, devido ter sido reproduzida num número menor de repetições por eletroantegráfico, precisam ser analisadas minuciosamente de forma individual.

Discussão

Nesse estudo, a quantidade de compostos identificados a partir de apenas 20 larvas em ambiente isolado, ratifica o desafio da comunicação das abelhas na colônia, um ambiente quimicamente complexo (CARROL; DUEHL, 2012), que envolve compostos provenientes da cera, mel e pólen, além da liberação de feromônios da rainha e das operárias como os feromônios de reconhecimento social, sexuais, de agregação, trilha e o feromônio de alarme (EL-GHANY, 2019; LEONHARDT, 2017).

De modo geral, os compostos relacionados à comunicação das abelhas sem ferrão pertencem ao grupo dos terpenos, álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas e até mesmo hidrocarbonetos, grupo de compostos menos voláteis (LEONHARDT, 2017). Nesse estudo, os compostos identificados em larvas mortas pertencem ao grupo dos hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e ácido carboxílico. Embora a identidade de três desses compostos não tenha sido verificada em estudos de ecologia química: o hidrocarboneto 2,4 dimetilhexano, o álcool 6-metil 2-heptanol e o éster 9-oxononanoato de metila, esse também encontrado na literatura pelo sinônimo ácido nonanóico, 9-oxo,

éster metílico. Para os demais compostos foi possível identificar função na comunicação dos mais diversos grupos de insetos, desse modo, direcionamos as pesquisas com base na ordem Hymenoptera principalmente para Apidae, quando havia registro.

Do grupo dos aldeídos verificados em nosso estudo, apenas o heptanal não foi relatado como componente volátil em abelhas, mas foi indicado como composto das flores de cultivares de morango com função atrativa para a abelha solitária *Osmia bicornis* (KLATT *et al.*, 2013). Para o nonanal encontramos registro da ocorrência em nove espécies de abelhas sem ferrão, dentre as quais destacamos os estudos de identificação associado a ensaio comportamental ou olfativo. Neste sentido, esse composto foi descrito como componente da glândula mandibular de abelhas operárias de *Frieseomelitta varia* com resposta eletroantenográfica ao padrão sintético e ao extrato da glândula (CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2002) e para *Trigona spinipes* apresentou comportamento defensivo no teste de campo (SCHORKOPF *et al.*, 2009). O decanal foi reportado em abelhas apenas no estudo de Francke *et al.* (2000), em *Trigona truculenta* e *Tetragona clavipes* como componente da secreção cefálica de operárias, mas os autores não realizaram testes comportamentais para indicar função nessas espécies.

Com relação aos hidrocarbonetos, o vinilbenzeno também identificado como estireno, foi relatado apenas na ordem Lepidoptera, extraído das asas de adultos de *Papilio protenor* (ÔMURA; YANAI; HONDA, 2012), sem informações sobre função na comunicação. O 8-heptadeceno, um hidrocarboneto acíclico, também não foi reportado em estudos com abelhas, esse composto é um feromônio de recrutamento secretado pela glândula de Dufour da formiga *Diacamma* sp. (TSUJII *et al.*, 2014). O heptadecano e hexadecano foram identificados em espécies de abelha sem ferrão, no entanto sua função na comunicação não foi realizada nos estudos de Cruz-López *et al.* (2007), em *Oxytrigona mediorufa* e nos estudos de Jarau *et al.* (2010), estudando feromônios de trilha em *Trigona corvina*.

O ácido carboxílico, ácido dodecanóico, verificado em nosso estudo foi relatado por Francke *et al.* (2000) em três espécies de abelha sem ferrão *Trigona hyalinata*, *T. hypogea* e *T. truculenta*. Bem como em *Plebeia droryana* sendo

extraído da glândula abdominal dessa abelha (PIANARO *et al.*, 2009). Em *Apis*, esse composto foi verificado como componente da glândula de Nasonov junto com outros 17 ácidos carboxílicos, e no bioensaio comportamental os manequins impregnados com o extrato dessa glândula foram removidos pelas operárias (KLETT *et al.*, 2021).

Os ésteres tetradecanoato de metila e hexadecanoato de metila/ palmitato de metila são compostos bioativos do feromônio da rainha de *Bombus terrestris*. O hexadecanoato de metila também foi reportado em *Melipona beecheii* mas não foi testado em bioensaios (CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2005).

Do grupo das cetonas, 2-hexanona e 3-hexanona foram identificadas em nosso estudo. A 2-hexanona foi reportada como componente do feromônio de agregação de percevejos *Cimex lectularius*, em bioensaios de campo e laboratório (GRIES *et al.*, 2014). Já a 3-hexanona foi relatada como componente volátil da planta alfafa e funcionou como atrativo para fêmeas de uma praga importante dessa cultura, o percevejo *Adelphocoris lineolatus* (SUN *et al.*, 2013). Em abelhas, tanto 2-hexanona quanto 3-hexanona compõem o extrato de glândulas mandibulares de machos de *Scaptotrigona depilis* cujo teste comportamental revelou reações diferentes entre machos e fêmeas, as fêmeas reagiram com luta e os machos com fuga (SCHORKOPF, 2016), no entanto, não foi realizado teste com os padrões sintéticos individuais para confirmar o composto responsável por desencadear esses comportamentos.

Para o grupo álcool, verificamos a presença do 3-hexanol, 2-hexanol e 1-hexanol. Assim como para as cetonas, o 3-hexanol, 2-hexanol que também foram reportados no estudo de Schorkopf (2016), sem indicação da função comportamental. Nos estudos com abelhas do gênero *Apis* o 1-hexanol foi indicado como feromônio de alarme, que é liberado pelas operárias durante ameaça induzindo o recrutamento das abelhas em direção a fonte de odor (WAGER; BREED, 2000).

O álcool 1-hexanol é um composto importante em nosso estudo uma vez que produziu despolarização nas antenas de operárias de *M. quadrifasciata*, ou seja, é um composto bioativo para essa espécie. Esse composto não foi relatado como responsável pelo comportamento de remoção de crias mortas em abelhas

do gênero *Apis*, no entanto nos estudos desse gênero os compostos estão relacionados aos COV's emanados de crias doentes (SWANSON *et al.*, 2009) ou parasitadas (MONDET *et al.*, 2021; WAGONER *et al.*, 2020), além das diferenças analíticas, escolha da fase das crias e de tratamento dado às amostras.

A escolha da fase de larva para os testes eletroantegráficos em *M. quadrifasciata* é baseada nos resultados do experimento de campo e da análise de COV's relatados no artigo anterior dessa tese, no qual a remoção de larvas ocorre primeiro quando comparada a remoção da fase de pupa, bem como a preferência de remoção de crias mortas por nitrogênio líquido. No contexto do nosso estudo, o composto identificado é proveniente das larvas saudáveis que foram mortas por congelamento, o que nos leva a crer que (i) esse composto compõe o perfil das crias, no entanto sua abundância após a morte é modificada e isso pode estimular a remoção (LIENDO *et al.*, 2021) ou (ii) esse composto em *M. quadrifasciata* pode ser produto da morte. Para elucidar essas possibilidades deverá ser realizado um teste de aeração com larvas vivas e confrontar os perfis de COV'S utilizando o mesmo método de extração e análise.

Com base na função já descrita para o 1-hexanol em *Apis* (WAGER; BREED, 2000), acreditamos que esse composto também pode ser um sinal de alarme em *M. quadrifasciata*, aqui o sinal deve recrutar as operárias para remover as crias mortas, que também é uma estratégia de defesa para a colônia. No entanto isso deverá ser testado.

Vale destacar que o composto sugerido como bioativo nesse estudo não tem as maiores abundâncias relativas do extrato (1-hexanol= 0,01%), mas fora suficiente para desencadear a resposta eletrofisiológica. O estudo de Franke *et al.* (2000), com a espécie *Tetragona clavipes* também apresentou abundância relativa menor que 1% para o 1-hexanol, semelhante ao verificado em nosso estudo.

O nonanal, apesar de estar presente na composição do extrato utilizado nos bioensaios, não apresentou resposta ativa, embora tenha sido reportado em testes de EAG para abelhas como já foi discutido aqui. No entanto, ainda não conhecemos a base química da remoção de crias em abelhas sem ferrão. O

composto bioativo aqui sugerido, pode produzir melhores respostas em associação a outros compostos do extrato. Assim, devem ser realizados ensaios comportamentais para testar nossa previsão de que esses compostos são sinais de morte em *M. quadrifasciata*.

Conclusão

Esse é o primeiro estudo que indica um composto candidato ao comportamento higiênico em abelhas sem ferrão. Novos estudos serão realizados a fim de avaliar a resposta comportamental das abelhas ao 1-hexanol em ensaios de campo e de laboratório. O estudo dos compostos voláteis relacionados ao comportamento higiênico das abelhas poderá contribuir para o desenvolvimento de ferramentas de seleção de colônias com base no grau de higiene.

Referências bibliográficas

- BIGIO, G.; SCHÜRCH, R.; RATNIEKS, F. L. W. Hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera: Apidae): effects of brood, food, and time of the year. **Journal of economic entomology**, [S.l.], v. 106, n. 6, p. 2280-2285, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1603/EC13076>
- BROWN, W. L.; JR. EISNER, T.; WHITTAKER, R. H. Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers. **Bioscience**, v. 20, n 21, 1970.
- CARROLL, M. J.; DUEHL, A. J. Collection of volatiles from honeybee larvae and adults enclosed on brood frames. **Apidologie**, v. 43, p. 715-730, 2012. DOI: [10.1007/s13592-012-0153-x](https://doi.org/10.1007/s13592-012-0153-x)
- CHEN, H. H.; ZHAO, Y. X.; KANG, L. Antennal sensilla of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) in relation to food preferences and habits. **Journal of Biosciences**, v. 28, p. 743-752, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02708435>
- CRUZ-LANDIM, C. da. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009. 408 p. DOI: <https://doi.org/10.7476/9788539304301>
- CRUZ-LÓPEZ, L.; AGUILAR, S.; MALO, E. A.; RINCÓN, M.; GUZMAN, M.; ROJAS, J. C. Electroantennogram and behavioral responses of workers of the stingless bee *Oxytrigona mediorufa* to mandibular gland volatiles. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 123, p. 43-47, 2007. DOI: [10.1111/j.1570-7458.2007.00522.x](https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2007.00522.x)
- CRUZ-LÓPEZ, L.; MALO, E. A.; MORGAN, E. D.; RINCON, M.; GUZMAN, M.; ROJAS, J. C. Mandibular gland secretion of *Melipona beecheii*: chemistry and behavior. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, p. 1621-1632, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-005-5802-3>

- CRUZ-LÓPEZ, L.; PATRICIO, E. F. L. R. A.; MAILE, R.; MORGAN, E. D. Secretions of stingless bees: cephalic secretions of two *Frieseomelitta* species. **Journal of Insect Physiology**, 48:453-458, 2002. DOI: 10.1016/s0022-1910(02)00066-5
- EL-GHANY, N. M. A. Semiochemicals for controlling insect pests. **Journal of Plant Protection Research**, v. 59, n. 1, p. 1-11, 2019. DOI: 10.24425/jppr.2019.126036
- El-Sayed AM 2021. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. <<http://www.pherobase.com>>. Acessado em 12/06/2021.
- FRANCKE, W.; LÜBKE, G.; SCHRÖDER, W.; RECKZIEGEL, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; KLEINERT, A.; ENGELS, E.; HARTFELDER, K.; RADTKE, R.; ENGELS, W. Identification of oxygen containing volatiles in cephalic secretions of workers of Brazilian stingless bees. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, p. 562-571, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532000000600003>
- GILLIAM, M.; TABER, S.; RICHARDSON, G. V. Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. **Apidologie**, v. 14, p. 29-39, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:19830103>
- GRIES, R.; BRITTON, R.; HOLMES, M.; ZHAI, H.; DRAPER, J.; GRIES, G. Bed bug aggregation pheromone finally identified. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 127, n. 4, p. 1151-1154, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201409890>
- JARAU, S.; DAMBACHER, J.; TWELE, R.; AGUILAR, I.; FRANCKE, W.; AYASSE, M. The trail pheromone of a stingless bee, *Trigona corvina* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), varies between populations. **Chemical Senses**, v. 35, p. 593-601, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq057>
- JESUS, J. N.; CHAMBÓ, E. D.; SODRÉ, G. S.; OLIVEIRA, N. T. E.; CARVALHO, C. A. L. Hygienic behavior in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini). **Apidologie**, v. 48, n. 4, p. 504-512, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0495-5>
- KARLSON, P.; BUTENANDT, A. Pheromones (ectohormones) in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 4, n. 1, p. 39-58, 1959.
- KLATT, B. K.; BURMEISTER, C.; WESTPHAL, C.; TSCHARNTKE, T.; VON FRAGSTEIN, M. Flower volatiles, crop varieties and bee responses. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72724, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072724>
- KLETT, K.; ZHANG, J. J.; ZHANG, Y. Y.; WANG, Z.; DONG, S.; TAN, K. The Nasonov gland pheromone as a potential source of death cue in *Apis cerana*. **Journal of Insect Physiology**, v. 131, p. 104238, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2021.104238>
- LAW, J. H.; REGNIER, F. E. Pheromones. **Annual Review of Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 533-548, 1971.
- LECLERCQ, G.; FRANCIS, F.; GENGLER, N.; BLACQUIÈRE, T. Bioassays to quantify hygienic behavior in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies: a review. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 5, p. 663-673, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1494916>
- LEONHARDT, S. Chemical Ecology of Stingless Bees. **Journal of Chemical Ecology**, v. 43, n. 4, p. 385-402, 2017. DOI: 10.1007/s10886-017-0837-9
- LIENDO, M. C.; MUNTAABSKI, I.; RUSSO, R. M.; LANZAVECCHIA, S. B.; SEGURA, D. F.; PALACIO, M. A.; CLADERA, J. L.; FERNÁNDEZ, P. C.; SCANNAPIECO, A. C. Temporal changes in volatile profiles of *Varroa destructor*-infested brood may trigger hygienic behavior in

Apis mellifera. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 169, n. 6, p. 563–574, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/eea.13048>

MCAFEE, A.; CHAPMAN, A.; IOVINELLA, I.; GALLAGHER-KURTZKE, Y.; COLLINS, T. F.; HIGO, H.; MADILAO, L. L.; PELOSI, P.; FOSTER, L. J. A death pheromone, oleic acid, triggers hygienic behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5719, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24054-2>

MONDET, F.; BLANCHARD, S.; BARTHES, N.; BESLAY, D.; BORDIER, C.; COSTAGLIOLA, G.; HERVÉ, M. R.; LAPEYRE, B.; KIM, S. H.; BASSO, B.; MERCER, A. R.; LE CONTE, Y. Chemical detection triggers honey bee defense against a destructive parasitic threat. **Nature Chemical Biology**, v. 17, n. 5, p. 524-530, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00720-3>

NAZZI, F.; DELLA VEDOVA, G.; D'AGARO, M. A semiochemical from brood cells infested by *Varroa destructor* triggers hygienic behaviour in *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 35, p. 65-70, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2003065>

NIST- National Institute of Standards and Technology. < <https://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acessado em 12 de junho de 2021.

ÔMURA, H.; YANAI, N.; HONDA, K. Sexual dimorphism in scent substances and cuticular lipids of adult *Papilio protenor* butterflies. **Zeitschrift für Naturforschung C. Journal of Biosciences**. 67:331-341, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-2012-5-614>

RUBENSTEIN, D. R.; J. ALCOCK. **Animal behavior: an evolutionary approach**. Editora: Sinauer Associates, Sunderland, MA, 11^a ed. 672 p., 2018.

SCHORKOPF, D. L. P.; HRNCIR, M.; MATEUS, S.; ZUCCHI, R.; SCHMIDT, V. M.; BARTH, F. G. Mandibular gland secretions of meliponine worker bees: further evidence for their role in interspecific and intraspecific defence and aggression and against their role in food source signalling. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 1153-1162, 2009. DOI: 10.1242/jeb.021113. PMID: 19329748.

SCHORKOPF, D. L. P. Male meliponine bees (*Scaptotrigona* aff. *depilis*) produce alarm pheromones to which workers respond with fight and males with flight. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 202, p. 667-678, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00359-016-1109-9>

SPIVAK, M., DANKA, R. G. Perspectives on hygienic behavior in *Apis mellifera* and other social insects. **Apidologie**, v. 52, p. 1-16, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00784-z>

SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Honey bee hygienic behavior. **American Bee Journal**, v. 138, n. 4, p. 283- 286, 1998.

SUN, L, GU S.H.; XIAO, H. J.; ZHOU, J.J.; GUO, Y. Y.; LIU, Z. W.; ZHANG, Y. J. The preferential binding of a sensory organ specific odorant binding protein of the alfalfa plant bug *Adelphocoris lineolatus* AlinOBP10 to biologically active host plant volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 9, p.1221-31, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0333-9>

SWANSON, J. A. I.; TORTO, B.; KELLS, S. A.; MESCE, K. A.; TUMLINSON, J. H.; SPIVAK, M. Odorants that induce hygienic behavior in honeybees: identification of volatile compounds in chalkbrood-infected honeybee larvae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 9, p. 1108-1116, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9683-8>

TSUJII, N. F.; TOKUNAGA, K.; AKINO, T.; TSUJI, K.; YAMAOKA, R. Identification of the tandem running pheromone in *Diacamma* sp. from Japan (Hymenoptera,

Formicidae). **Sociobiology**, v. 59, n. 4, p. 1281-1295, 2014. DOI: <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v59i4.516>

WAGER, B. R.; BREED, M. D. Does honey bee sting alarm pheromone give orientation information to defensive bees?. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 93, n. 6, p. 1329-1332, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2000\)093\[1329:DHBSAP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2000)093[1329:DHBSAP]2.0.CO;2)

WAGONER, K.; MILLAR, J G; KELLER, J; BELLO, J.; WAIKER, P; SCHAL, C.; SPIVAK, M; RUEPELL, O. Hygiene-Eliciting Brood Semiochemicals as a Tool for Assaying Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Resistance to *Varroa* (Mesostigmata: Varroidae), **Journal of Insect Science**, v. 21, n. 6, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab064>

WILSON-RICH, N.; SPIVAK, M.; FEFFERMAN, N. H.; STARKS, P. T. Genetic, Individual and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. **Annual Review of Entomology**, v. 54, n. 1, p. 405-423, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093301>

YAN, H.; JAFARI, S.; PASK, G.; ZHOU, X.; REINBERG, D.; DESPLAN, C. Evolution, developmental expression and function of odorant receptors in insects. **The Journal of Experimental Biology**, v. 223, p. jeb208215, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.208215>

YAN, H.; LIEBIG, J. Genetic basis of chemical communication in eusocial insects. **Genes & Development**, v. 35, n. 7-8, p. 470-482, 2021. DOI: [10.1101/gad.346965.120](https://doi.org/10.1101/gad.346965.120)

ARTIGO IV

SENSILAS OLFATIVAS EM OPERÁRIAS DE *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEPELETIER, 1836 (APIDAE, MELIPONINAE) REMOVEDORAS E NÃO REMOVEDORAS DE CRIAS MORTAS³

³ O texto será ajustado e submetido para publicação no formato de Nota Científica no periódico Ciência Rural.

SENSILAS OLFATIVAS EM OPERÁRIAS DE *M. quadrifasciata anthidioides* LEPELETIER, 1836 (APIDAE, MELIPONINAE) REMOVEDORAS E NÃO REMOVEDORAS DE CRIAS MORTAS

Resumo: A sofisticada comunicação química dos insetos permite que as abelhas desempenhem funções importantes como a identificação precoce de indivíduos mortos ou doentes no interior dos discos de cria, esse comportamento é conhecido como comportamento higiênico. O objetivo desse estudo foi realizar a identificação e quantificação das sensilas olfativas presentes nas faces ventral e dorsal de antenas esquerdas e direitas de abelhas operárias de ascendência higiênica e não higiênica, por meio de microscopia eletrônica de varredura. Três tipos de sensila olfativa foram analisados, sensila placodea, basicônica e sensila tricoide e seus subtipos (ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6). Todos os tipos de sensilas estão presentes nas diferentes categorias estudadas, mas diferem quanto a sua distribuição no flagelo. A sensila ST3 está restrita a região basal e as demais sensilas estão distribuídas ao longo de todo o flagelo. As sensilas mais abundantes foram as ST1, ST4 e placodea. A categoria não higiênica apresentou maior quantidade dessas sensilas comparada às higiênicas. Não foram encontradas diferenças expressivas no tamanho das sensilas entre as categorias avaliadas. Mas, a diferença de tamanho entre os tipos de sensila é clara, sendo a menor a sensila basicônica ($9,9 \pm 1,0$), seguida da ST2 ($11,03 \pm 1,3$), já as maiores sensilas são ST3 ($23,5 \pm 4,7$) e ST6 ($23,2 \pm 2,7$). A face dorsal apresentou maior quantidade de sensilas, o que deve ser levado em consideração em testes comportamentais. Especificamente para o comportamento higiênico, os resultados mostram que não é a quantidade ou tamanho das sensilas que reflete a capacidade olfativa das abelhas em higiênicas.

Palavras chaves: Abelha sem ferrão; Antena; Comportamento higiênico; Microscopia eletrônica de varredura.

**OLFACTORY SENSILES IN WORKERS OF *M. quadrifasciata anthidioides*
LEPELETIER, 1836 (APIDAE, MELIPONINAE) HYGIENIC AND NON-
HYGIENIC TOWARDS DEAD BROOD**

Abstract: The sophisticated chemical communication of insects allows bees to perform meaningful functions such as identifying dead or sick individuals inside the brood discs. This behavior is known as hygienic behavior. The objective of this study was to identify and quantify the olfactory sensilla present on the ventral and dorsal faces of the left and right antennae of worker bees of hygienic and non-hygienic ancestry, using scanning electron microscopy. Three types of olfactory sensilla were analyzed, placodea, basiconic and trichoid sensilla and their subtypes (ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6). All types of sensilla are present in the different categories studied, but they differ in their distribution in the flagellum. The ST3 sensilla are restricted to the basal region, and the other sensilla are distributed along the entire flagellum. The most abundant sensilla were ST1, ST4, and placodea. The non-hygienic category presented more of these sensilla when compared to the hygienic ones. There were no significant differences in sensilla size between the evaluated classifications. However, the difference in size between the types of sensilla is clear, the smallest being the basiconic sensilla (9.9 ± 1.0), followed by ST2 (11.03 ± 1.3), whereas the largest sensilla are ST3 (23.5 ± 4.7) and ST6 (23.2 ± 2.7). The dorsal surface exhibited more sensilla, which behavioral essays should consider. Specifically for hygienic behavior, the results show that it is not the number or size of sensilla that reflects the olfactory capacity of hygienic bees.

Keywords: Stingless bee; Antenna; Hygienic behavior; Scanning electron microscopy.

Introdução

As perdas das populações de abelhas relacionadas principalmente aos efeitos sinérgicos entre a ocorrência de pragas e doenças, alterações do clima e o uso de agrotóxicos elevam a preocupação do nível de sanidade das colônias (GOULSON, 2019). Dentre as estratégias para manter as colônias sadias destaca-se a seleção em função do comportamento higiênico, uma vez que colônias higiênicas possuem operárias capazes de identificar, desopercular e remover crias doentes ou mortas, a fim de evitar a propagação de microorganismos no interior das colônias (SPIVAK; REUTER, 2001). As abelhas de ascendência não higiênica também removem crias mortas, porém em ritmo mais lento, o que pode beneficiar a proliferação dos agentes patogênicos (AL TOUFALIA *et al.*, 2018). A motivação para a remoção está relacionada aos compostos voláteis emanados das crias mortas, que são captados pelas sensilas olfativas presentes nas antenas das abelhas operárias (GRAMACHO *et al.*, 2003).

As sensilas dos tipos tricoides, placoides e basicônicas são responsáveis pela quimiorrecepção (FRASNELLI *et al.*, 2010; RAVAIANO *et al.*, 2014). No interior destas sensilas, encontram-se neurônios responsáveis por processar as informações em função do tipo de sinal recebido e desencadear um comportamento de resposta nos insetos (CHEN, 2003).

Diversos estudos têm sido realizados em abelhas do gênero *Apis* (STORT; MORAES-ALVES, 1999; FRASNELLI *et al.*, 2010) e espécies de abelhas sem ferrão, como *Melipona scutellaris* (NASCIMENTO *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2017), *Tetragonisca angustula* (DOHANIK *et al.*, 2017) e *Melipona quadrifasciata* (MORAES; CRUZ-LANDIM, 1972; AZEVEDO *et al.*, 2008; RAVAIANO *et al.*, 2014). O foco desses estudos foi principalmente compreender o padrão de distribuição das sensilas. Até então, somente Gramacho *et al.* (2003) investigaram a relação entre grau de higiene das colônias e o padrão de sensilas olfativas do tipo placodea em *A. mellifera*.

O presente estudo buscou comparar o padrão das sensilas olfativas de abelhas envolvidas ativamente no processo de remoção daquelas que não

removeram crias mortas. A hipótese é que existe diferença na quantidade, tamanho e distribuição das sensilas olfativas entre as abelhas higiênicas e não higiênicas.

Material e Métodos

Insetos

Foram utilizadas colônias de *M. quadrifasciata anthidioides* acondicionadas em caixa INPA e mantidas no meliponário do Grupo de Pesquisa Insecta da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, município de Cruz das Almas, Bahia (12°39'20" W e 39°07'23" S, altitude 220 m). As colônias foram selecionadas por meio do comportamento higiênico através do método de congelamento com nitrogênio líquido (SPIVAK; REUTER, 1998; JESUS *et al.*, 2017), e classificadas quanto ao grau de higiene de acordo com Spivak; Reuter (1998b). As colônias higiênicas serviram como doadoras de discos de cria para obtenção de amostras e indivíduos.

Os discos de crias prestes a emergir foram retirados das colônias e acondicionados em gaiolas plásticas recobertas por tecido *voil*, mantidos em estufa BOD (*Biological Oxygen Demand*) sob temperatura de 27 °C ± 5 °C e umidade de 70% ± 5%, com escotofase de 24 horas. As abelhas recém-emergidas foram coletadas diariamente, marcadas com etiquetas numeradas (EH Thorne, Ltd., Lincolnshire, Reino Unido), fixadas na face dorsal do tórax para identificação individual e controle de idade. Após a marcação, as abelhas foram transferidas para as colônias de observação.

Cada colônia de observação foi composta por aproximadamente 200 abelhas marcadas com idade entre 01 e 20 dias (ARATHI; BURNS; SPIVAK 2000), sendo em média 10 abelhas por idade. As colônias de observação foram montadas em caixas modelo INPA com tampa de vidro antirreflexo com 2 mm de espessura, instaladas no Laboratório de Comportamento de Insetos. Os ninhos foram conectados ao exterior via tubos plásticos conduzidos através da

parede do edifício, assim as abelhas realizavam as atividades externas normalmente.

Uma seção de disco de cria contendo larvas mortas por congelamento em nitrogênio líquido foi inserida na colônia de observação e iniciada a filmagem do comportamento a fim de identificar e coletar as abelhas operárias que realizaram a remoção das crias mortas no período de 24 horas. O processo foi também realizado para a colônia contendo abelhas de ascendência não higiênica, na qual foram coletadas abelhas que não se envolveram em atividades de remoção e/ou desoperculação.

Preparação das amostras para MEV

Foram coletadas seis abelhas higiênicas (removedoras e desoperculadoras de crias mortas) e seis não higiênicas, totalizando 12 antenas para cada categoria. As antenas foram distribuídas para análise entre antenas esquerdas e direitas e face ventral e dorsal, dentro de cada categoria, conforme apresentado na Figura 1. Em seguida as abelhas foram anestesiadas em baixa temperatura (-20°C) durante cinco minutos para proceder a excisão das cabeças. Em seguida, as amostras foram imersas em solução fixadora composta por tampão Cacodilato Na 0,2 M, Glutaraldeído 25%, Paraformaldeído 16%. Posteriormente, as antenas foram excisadas das cabeças e desidratadas numa série graduada de etanol (70%, 80% e 95%, por cinco minutos cada) e foram dispostas em papel filtro para evaporação do solvente por 1 minuto.

Microscopia eletrônica de varredura - MEV

Após os procedimentos de fixação e desidratação as antenas foram montadas na região dorsal e ventral sobre fita de carbono dupla face fixada sobre *Stub* (porta amostra de metal) e submetidas ao processo de metalização por revestimento através de pulverização com Ouro a 45 mA por 200 segundos num metalizador unidade Q150R ES, Quorum. Posteriormente, as antenas foram examinadas através do microscópio eletrônico de varredura unidade Tescan

Mark, modelo VEGA3 LMU, operando a 20 kv. A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Laboratório de análise instrumental do Instituto Federal de Alagoas – IFAL, Maceió- AL, Brasil.

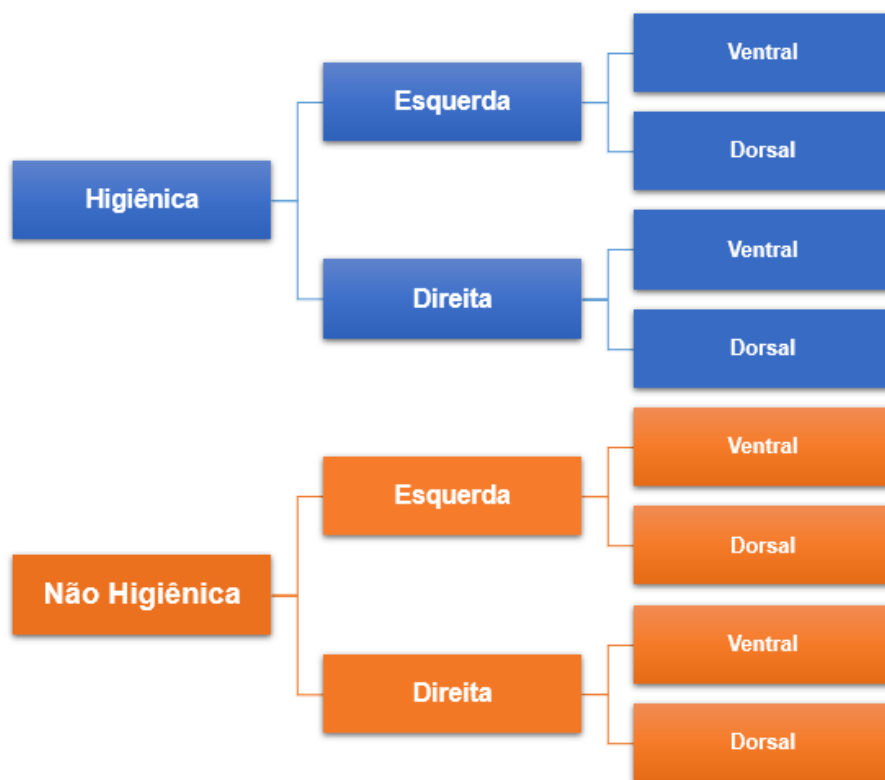


Figura 1. Esquema da metodologia para obtenção de imagens em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de antenas de operárias de *M. quadrifasciata anthidioides*. Sendo 3 antenas para cada categoria, totalizando 24 antenas.

A antena de *M. quadrifasciata anthidioides* é geniculada apresenta três segmentos que a compõem, o escapo que conecta todos os segmentos antenais à cabeça da abelha, seguido do pedicelo e por último o flagelo (Figura 1A). O maior segmento antenal é o flagelo composto por várias unidades menores ligadas entre si, denominadas de flagelômeros/antenômeros. Em detalhe as imagens dos flagelômeros basais (1 e 2), mediais (5 e 6) e apicais (9 e 10) (Figura 2B).

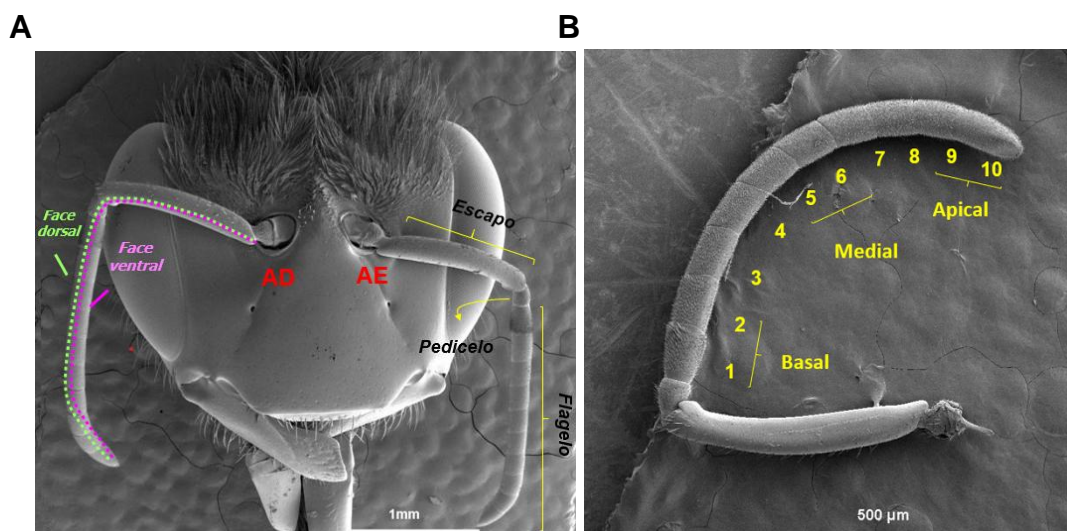


Figura 3. (A) Microfotografia da cabeça de operária de *M. quadrifasciata anthidioides*, obtida em microscópio eletrônico de varredura e a indicação da localização de cada estrutura presente; AD= antena direita e AE= antena esquerda; (B) Antena com numeração dos antenômeros e indicação das regiões basal, medial e apical que tiveram as sensilas mensuradas e quantificadas.

Terminologia e análise dos dados

As micrografias dos segmentos antenais e sensilas foram analisadas a partir da análise de microscopia eletrônica de varredura descrito acima. As estruturas olfativas foram identificadas e tiveram sua nomenclatura baseada em características externas de acordo com RAVAIANO et al. (2014) e comparadas de acordo com materiais da mesma natureza presente na literatura científica com foco em abelhas (Frasnelli et al., 2010; Gramacho et al., 2003; Ågren, 1989) e outras ordens de insetos.

Foi realizada medição dos segmentos antenais, sensilas e flagelomeros por meio do software Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Os registros foram separados em abelhas higiênicas e não higiênicas e em cada imagem foi delimitada uma área de 400 x 400 *pixels* para mensuração das sensilas olfativas. Foi medido também o comprimento (μm) de 10 sensilas de cada tipo e subtipo presente ao longo do flagelo. Os parâmetros avaliados foram mensurados e apresentadas as médias e desvio padrão.

Resultados

Morfometria do segmento antenal

A partir das análises em microscópio eletrônico de varredura, foram obtidas microfotografias das antenas de abelhas operárias higiênicas (removedoras e desoperculadoras de crias mortas) e não higiênicas, cujas medidas de largura e comprimento de cada parte da antena estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Comprimento e largura do escapo, pedicelo e flagelo das antenas esquerdas e direitas de abelhas higiênicas (n=6) e não higiênicas (n=6) de *Melipona quadrifasciata anthidioides* apresentadas em média e desvio padrão.

PARÂMETROS	H. DIREITA		H. ESQUERDA		NH. DIREITA		NH. ESQUERDA	
	MÉDIA	EP	MÉDIA	EP	MÉDIA	EP	MÉDIA	EP
C. escapo	1.312,30	20,26	1.288,82	22,92	1.221,49	67,72	1.219,76	41,99
C. pedicelo	226,79	7,62	235,53	7,63	199,89	8,57	235,53	7,63
C. flagelo	2.228,82	81,48	2.143,89	76,10	2.130,52	36,93	2.110,8	50,43
L. escapo	210,22	5,65	202,77	5,52	194,84	7,66	181,47	8,71
L. pedicelo	168,53	3,56	165,39	3,83	156,61	5,13	151,73	6,54
L. flagelo	193,38	3,80	196,17	2,86	182,32	7,35	175,17	7,46

C.= comprimento; L.= largura; H.= higiênica; NH.= não higiênica; EP= erro padrão; Unidade de medida: convertida de micrometro para milímetros.

A partir da média morfométrica do segmento antenal foi observado que o pedicelo é o menor segmento e o flagelo o maior, tanto nas antenas da direita quanto da esquerda em abelhas *Melipona quadrifasciata anthidioides* higiênica e não higiênicas

Tipologia e distribuição das sensilas antenais

Nas microfotografias da antena foram observadas também estruturas sensilares ao longo de todo comprimento antenal, com foco no flagelo que

compõem estruturas sensilares diversas. Foram identificados e analisados os três principais tipos de sensilas olfativas: placodea (SP), basicônica (SB) e tricoide (ST) (Figura 4). Das sensilas tricoides foram identificados seis subtipos de acordo com a forma e comprimento (ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 e ST6).

Sensila placodea

A sensila placodea observada neste estudo, apresenta forma de placa oval, nivelada paralelamente a cutícula da antena, sua estrutura possui um círculo levemente dilatado contornando sua forma arredondada. Sua distribuição foi observada ao longo do flagelo nas exterminadas medial e apical nas antenas das abelhas de comportamento higiênico e não higiênico. Nesse estudo não foram visualizados poros ou estrias nesse tipo de sensila.

Sensila basicônica

A sensila basicônica apresenta uma forma estrutural similar nas abelhas de CH e CNH, é caracterizada por uma base larga inserida numa covinha rasa na superfície da cutícula dos antenômeros, sua forma é robusta e uniforme com extremidade apical arredondada. Neste estudo foi observado a presença de dois subtipos de acordo com o comprimento e forma, além disso, também foi verificada a presença de poro único na exterminada apical desta sensila. A localização dessa estrutura sensilar foi verificada nos antenômeros mediais e distais do flagelo.

Sensila tricoide

Sensilas tricoides apresentam-se como pelos, cujo tamanho e forma variam, sendo então classificados como subtipos. A sensila ST1 é uma sensila curta, com extremidade direcionada a ponta apical da antena, não foi observado poros nessas sensilas. A ST2 é semelhante à ST1, mas tem forma e extremidade mais fina. A ST3, difere do padrão curto e reto, essa sensila tem perfil curvado e assemelha-se a uma “foice, está localizada no primeiro flagelômero, na base do flagelo. A ST4 é uma sensila que apresenta finas estrias longitudinais, com aspecto de pelo reto e aparentemente mais robusto. A ST5 é fina, com

extremidade afilada, porém sua curvatura limita-se a extremidade da sensila, ficando dessa forma mais alta em comparação as demais sensilas, exceto para a ST6 é uma sensila fina, longa e com pouca curvatura ou nenhuma curvatura na extremidade.

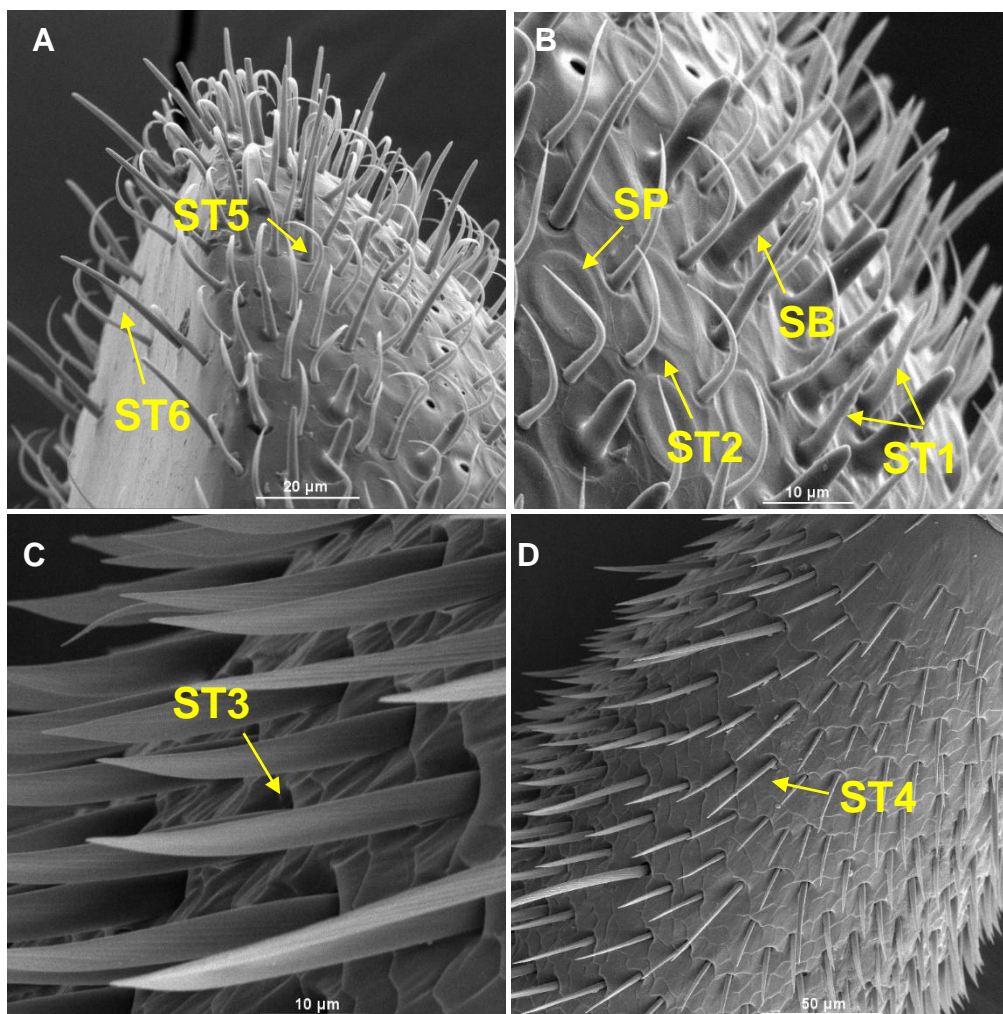


Figura 4. Microfotografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura mostrando em detalhe as sensilas antenais de *Melipona quadrifasciata anthidioides*: (A) Sensilas tricoides do tipo 5 (ST5) e tipo 6 (ST6), presentes na extremidade apical da antena no 10º flagelômero; (B) sensilas tricoides do tipo 1 (ST1) e tipo 2 (ST2), sensila placodea (SP), sensila basicônica (SB); (C) sensila tricoide do tipo 3 (ST3); (D) sensilas tricoides do tipo 4 (ST4) localizadas na extremidade basal da antena.

Existe uma variação da distribuição dos tipos de sensila ao longo do flagelo. A sensila ST3 só foi identificada na região basal da antena independente da face (ventral ou dorsal), posição (esquerda ou direita) e categoria (higiênica

ou não higiênica). Mais especificamente, a sensila ST3 ocorre no flagelômero 1, que é composto exclusivamente pelas sensilas ST3 e ST4. As sensilas ST5 e ST6 estão mais concentradas na região apical, mas foi possível observar algumas dessas sensilas também na região medial. As demais sensilas placodea, basicônica, ST1, ST2 e ST4 estão bem distribuídas por toda região medial e apical.

Foi observada em operárias higiênicas e não higiênicas numa área de 400x400 *pixels* uma média >50 para sensilas ST1, ST4 e placodea na região dorsal da antena direita. Na antena esquerda dorsal de operárias higiênicas e não higiênicas essa média > 50 de sensilas foi verificada para placodea e ST1, entretanto, esse dado foi concincidiu com as senilas ST3 em operárias CNH (Tabela 1 e 2).

Tabela 2. Média de sensilas olfativas antenais de **operárias higiênicas** (*M. quadrifasciata anthidioides*) presente em uma área de 400x400 *pixels* nos flagelômeros.

Sensila	Higiênica - DORSAL				Higiênica - VENTRAL			
	Direita		Esquerda		Direita		Esquerda	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Placodea	50,09	20,87	52,06	20,98	18,22	12,56	18,33	13,01
Basicônica	8,00	5,83	8,87	4,17	6,82	11,97	6,58	7,38
Tricoide 1	70,73	23,55	65,24	28,46	35,44	4,07	43,58	26,85
Tricoide 2	12,56	12,52	17,12	10,43	14,21	18,86	13,40	10,89
Tricoide 3	23,50	23,33	31,33	10,12	19,00	11,27	22,50	5,54
Tricoide 4	55,00	35,36	33,75	24,85	58,20	17,79	45,50	16,31
Tricoide 5	6,00	1,41	7,67	1,15	20,33	17,04	6,33	3,06
Tricoide 6	4,25	3,06	3,25	1,67	5,44	4,72	3,08	1,55

DP = Desvio padrão

Enquanto na região ventral de operárias higiênicas e não higiênica somente a ST4 apresentou uma média >50 de sensilas. As demais estruturas sensilares apresentaram média <50 de sensilas na face dorsal e ventral da antena direita e esquerda, independente da categoria higiênica e não higiênica (Tabela 1 e 2).

Tabela 3. Média de sensilas olfativas antenais de **operárias não higiênicas** (*M. quadrifasciata anthidioides*) presente em uma área de 400x400 pixels nos flagelômeros.

Sensila	Não Higiênica - DORSAL				Não Higiênica - VENTRAL			
	Direita		Esquerda		Direita		Esquerda	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Placodea	71,00	12,32	74,27	13,85	14,93	8,31	21,30	15,30
Basicônica	8,43	4,97	6,08	3,63	7,29	3,35	5,50	2,88
Tricoide 1	110,81	30,61	104,38	26,37	45,42	30,91	47,92	32,97
Tricoide 2	6,22	3,53	7,75	3,70	14,50	13,29	8,27	5,64
Tricoide 3	47,33	32,58	72,00	10,58	10,67	5,66	25,33	14,46
Tricoide 4	70,67	22,30	12,67	6,43	55,00	24,90	41,31	23,61
Tricoide 5	4,50	2,12	3,00	2,00	4,67	1,53	7,00	1,41
Tricoide 6	3,00	1,41	2,33	1,53	2,88	2,03	3,00	2,83

DP = Desvio padrão

As medidas de tamanho das sensilas são apresentadas nas Tabelas 4 e 5, para antenas de ascendência higiênica e não higiênica, respectivamente. Cada tipo de sensila apresenta um padrão de tamanho. A menor sensila verificada em nosso estudo é a sensila basicônica ($9,9 \pm 1,0$) seguida da ST2 ($11,03 \pm 1,3$), já as maiores sensilas são ST3 ($23,5 \pm 4,7$) e ST6 ($23,2 \pm 2,7$).

Tabela 4. Tamanho das sensilas olfativas de **operárias higiênicas** (*M. quadrifasciata anthidioides*) presentes em uma área de 400x400 pixels nos flagelômeros.

Sensila	Higiênica - DORSAL				Higiênica - VENTRAL			
	Direita		Esquerda		Direita		Esquerda	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Placodea	12,19	1,72	13,42	1,32	13,81	1,99	14,31	1,88
Basicônica	9,78	1,72	9,79	1,95	10,86	5,34	11,68	1,67
Tricoide 1	10,75	2,01	12,34	2,19	13,82	2,25	13,46	1,94
Tricoide 2	11,24	1,81	11,25	1,59	13,07	2,58	13,54	2,56
Tricoide 3	26,19	2,84	20,53	3,57	29,27	5,50	27,62	4,92
Tricoide 4	23,76	1,75	18,49	6,46	16,50	4,77	17,88	4,97
Tricoide 5	14,68	2,09	14,92	1,95	15,53	2,15	15,58	2,69
Tricoide 6	22,34	6,52	23,08	3,29	24,47	5,64	27,65	9,40

DP = desvio padrão

Não foi encontrado nesse estudo variação expressiva do tamanho das sensilas entre as categorias avaliadas.

Tabela 5. Tamanho das sensilas olfativas de operárias **não higiênicas** (*M. quadrifasciata anthidioides*) presentes em uma área de 400x400 pixels nos flagelomeros.

Sensila	Não Higiênica – DORSAL				Não Higiênica - VENTRAL			
	Direita		Esquerda		Direita		Esquerda	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Placodea	13,57	9,63	13,79	1,09	13,34	2,51	14,26	1,75
Basicônica	8,82	1,64	8,89	1,72	9,43	3,56	9,93	2,29
Tricoide 1	12,02	1,34	12,71	2,44	11,41	3,19	12,20	3,23
Tricoide 2	9,29	1,43	9,09	1,78	11,21	6,48	11,67	2,76
Tricoide 3	16,71	2,64	18,10	3,78	27,14	7,89	22,35	7,52
Tricoide 4	17,43	1,76	17,62	3,92	20,41	6,38	17,66	6,53
Tricoide 5	14,54	1,44	11,07	1,21	12,45	3,50	14,46	1,82
Tricoide 6	20,11	4,03	19,76	3,25	25,96	5,26	21,99	3,87

DP = desvio padrão

Discussão

As sensilas analisadas no presente estudo apresentam a morfologia e distribuição semelhante ao que foi relatado no estudo de Ravaiano *et al.* (2014) para *M. quadrifasciata anthidioides*.

Dentre as sensilas relacionadas à quimiorrecepção (sensilas tricoides e seus subtipos, placode e basicônica), apenas a sensila basicônica tem função exclusiva de quimiorrecepção (RAVAIANO *et al.*, 2014). Em nosso estudo verificamos a presença de poro nessa sensila, indicativo para quimiorrecepção. Foi verificada baixa abundância desse tipo de sensila, o que não era esperado na categoria de abelhas higiênicas, devido a maior sensibilidade olfativa durante a remoção de crias mortas. Assim, outros fatores devem estar associados à percepção olfativa como por exemplo a quantidade de neurônio que inerva as sensilas (NAKANISHI *et al.*, 2009; RENTHAL *et al.*, 2003).

A sensila placode é apontada por Gramacho *et al.* (2003) como responsável pela captação de odor que incita o comportamento higiênico nas

colônias, esses autores também não encontraram diferença significativa entre abelhas higiênicas e não higiênicas.

Os resultados encontrados no presente estudo como mais abundantes indicam as sensilas ST1, ST4 e a sensila placodea, resultado que já foi relatado por Ravaiano *et al.* (2014). A sensila ST1 pode exercer função de quimio e mecanorrecepção, dependendo da presença ou ausência de poros, nesse estudo não foi visualizada a presença de poros nessas sensilas. Estrias longitudinais foram verificadas nas sensilas ST3 e ST4, sobre as quais não há registro de influência na recepção olfativa. Mas devido à localização, principalmente da sensila ST3 ser restrita à região basal, acreditamos que tenha função mecanorreceptora. Como a ST4 também está presente em outras regiões da antena, sua função deve ser avaliada em futuros trabalhos.

A quantificação e mensuração das antenas esquerdas e direitas trazidas nesse estudo busca verificar possíveis diferenças de quantidade e/ou tamanho das sensilas entre as antenas de um mesmo indivíduo, o que poderia influenciar na percepção de voláteis durante a comunicação química. Nesse estudo, as antenas direitas e esquerdas não apresentam diferenças expressivas. Frasnelli *et al.* (2010) mostraram que em *Apis mellifera*, as sensilas olfativas (placodea, tricoide e basicônica) foram significativamente mais abundantes na superfície da antena direita do que na superfície da antena esquerda. Para McAfee *et al.* (2017), em estudo comportamental, a resposta das abelhas a uma fonte de odor é mais intensa quando utilizada antena esquerda nos ensaios eletrofisiológicos.

Com relação à face ventral e dorsal, em nosso estudo principalmente para as sensilas mais abundantes ST1 e placodea, a face dorsal apresentou maior quantidade de sensilas, tanto para antenas de abelhas higiênicas quanto não higiênicas. Era esperada diferença da quantidade e/ou tamanho de sensilas das antenas de abelgas higiênicas, aqui foi mostrado que para as sensilas ST1 e placodea, a categoria não higiênica apresenta maior quantidade de sensilas. Gramacho *et al.*, (2003) não encontraram maior número de sensila placodea nas antenas de abelhas higiênicas, em comparação com abelhas africanizadas não higiênicas.

Conclusão

Neste estudo não foram encontradas diferenças expressivas no tamanho das sensilas entre as categorias avaliadas, sugerindo que provavelmente não seja o tamanho ou mesmo a quantidade das sensilas que determinam a capacidade olfativa nas abelhas em higiênicas.

Referências bibliográficas

AL TOUFAILIA, H.; EVISON, S. E.; HUGHES, W. O.; RATNIEKS, F. L. Both hygienic and non-hygienic honeybee, *Apis mellifera*, colonies remove dead and diseased larvae from open brood cells. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1751, p. 20170201, 2018. DOI: 10.1098 / rstb.2017.0201.

ARATHI, H. S.; BURNS, I.; SPIVAK, M. Ethology of hygienic behaviour in the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): behavioural repertoire of hygienic bees. **Ethology**, v. 106, n. 4, p. 365-379, 2000.

AZEVEDO, D. O.; MATIELLO-GUSS, C. P.; RÖNNAU, M.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Post-embryonic development of the antennal sensilla in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Meliponini). **Microscopy Research and Technique**, v. 71, n. 3, p. 196-200, 2008. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.20539>. PMID:17992691

CARVALHO, W. J.; FUJIMURA, P. T.; BONETTI, A. M.; GOULART, L. R.; CLOONAN, K.; SILVA, N. M.; LEAL, W. S. Characterization of antennal sensilla, larvae morphology and olfactory genes of *Melipona scutellaris* stingless bee. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0174857, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174857>

CHEN, H. H.; ZHAO, Y. X.; KANG, L. Antennal sensilla of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) in relation to food preferences and habits. **Journal of Biosciences**, v. 28, p. 743-752, 2003. <https://doi.org/10.1007/BF02708435>

DOHANIK, V. T.; SOUZA, E. A.; LISBOA, L. C. O.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Development of antennal sensilla of *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Meliponini) during pupation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 2, p. 284-288, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.12515>

FRASNELLI, E.; ANFORA, G.; TRONA, F.; TESSAROLO, F.; VALLORTIGARA, G. Morpho-functional asymmetry of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 2, p. 221-225, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.046>

GOULSON, Dave. 2019. The insect apocalypse, and why it matters. **Current Biology**, v. 29, n. 19, p. R967-R971. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.069>

GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S.; STORT, A. C.; NORONHA, A. B. Is the number of antennal plate organs (sensilla placodea) greater in hygienic than in nonhygienic Africanized honey bees? **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 3, p. 309-316, 2003.

JESUS, J. N.; CHAMBÓ, E. D.; DA SILVA SODRÉ, G.; DE OLIVEIRA, N. T. E.; DE CARVALHO, C. A. L. Hygienic behavior in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini). **Apidologie**, v. 48, n. 4, p.504-512, 2017.

MCAFEE, A.; COLLINS, T. F.; MADILAO, L. L.; FOSTER, L. J. Odorant cues linked to social immunity induce lateralized antenna stimulation in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Scientific Reports**, [S. I.], v. 7, p. 46171, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep46171>

MORAES, R. L. M. S.; CRUZ-LANDIM, C. Estudo comparativo de órgãos sensoriais em abelhas com diferentes tipos de comunicação. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 32, p. 185-196, 1972.

NAKANISHI, A.; NISHINO, H.; WATANABE, H.; YOKOHARI, F.; NISHIKAWA, M. Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and distribution of sensilla on the flagellum. **Cell and Tissue Research**. v. 338, p. 79-97, 2009.

NASCIMENTO, M.A.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M.; MARTINS G.F. Estudos moleculares e morfológicos em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera). **EntomoBrasilis**, v. 6, n. 1, p. 64-67, 2013.

RAVAIANO, S. V.; FERREIRA, R. D.; CAMPOS, L. A.; MARTINS, G. F. The antennal sensilla of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a study of different sexes and castes. **Naturwissenschaften**, v. 101, n. 8, p. 603-611, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-014-1184-0>

RENTHAL, R.; VELASQUEZ, D.; OLMOS, D.; HAMPTON, J.; WERGIN, W. P. Structure and distribution of antennal sensilla of the red imported fire ant. **Micron**. 34:405-412, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(03\)00050-7](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(03)00050-7)

SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Honey bee hygienic behavior. **American Bee Journal**, v. 138, n. 4, p. 283- 286, 1998a.

SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Performance of hygienic honey bee colonies in a comercial apiary. **Apidologie**, v. 29, n. 1, p. 291-302, 1998b.

SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. **Apidologie**, v. 32, p. 555-565, 2001.

STORT, A. C.; MORAES-ALVES, M. M. B. Differences in the number of the antennal sensory structures of males of three honey bee types. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 1, p. 161-166, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71081999000100020>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi apresentada uma revisão sobre diferentes aspectos relacionados com o comportamento higiênico das abelhas sociais, particularmente para as abelhas sem ferrão, utilizando como modelo as espécies *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Melipona scutellaris*. Foi demonstrado que, tanto a técnica de indução da morte utilizada para avaliar o CH das colônias, quanto o estágio de desenvolvimento da cria exibem perfis químicos diferentes, que podem influenciar na remoção da cria e conseqüentemente na classificação da colônia como higiênica ou não higiênica.

A análise química por CG-EM indicou a presença de um total de 18 compostos pertencentes a seis grupos químicos distintos. O eletroantenograma indicou que as antenas das abelhas responderam em maior número de repetições para um composto no extrato natural, que foi sugerido por CG-EM como 1-hexanol. Esse composto é candidato a incitar o comportamento higiênico em *M. q. anthidioides*. Esse é o primeiro estudo que indica um composto candidato ao comportamento higiênico em abelhas sem ferrão.

Os compostos identificados neste estudo podem ser usados como estímulo para verificar a eficiência de remoção de crias em testes comportamentais em abelhas, além de contribuir para o conhecimento dos compostos voláteis em espécies de abelha sem ferrão. O estudo dos compostos voláteis relacionados ao comportamento higiênico das abelhas poderá contribuir para o desenvolvimento de ferramentas de seleção de colônias com base no grau de higiene.

O estudo das sensilas indicou as ST1, ST4 e placodea como as sensilas mais abundantes em antenas de *M. q. anthidioides*. Especificamente para o comportamento higiênico, os resultados mostram que não é a quantidade ou tamanho das sensilas que reflete a capacidade olfativa das abelhas em higiênicas. Neste sentido, novos estudos devem ser realizados utilizando abordagens de morfologia estrutural e fisiológica das antenas das abelhas a fim de compreender percepção sensorial para o comportamento higiênico.

