

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto**  
**Programa de Pós-Graduação em Entomologia**

**“Desenvolvimento e análise do efeito de dietas protéicas  
como suplementação nutricional para abelhas  
*Apis mellifera*”**

**ALINE PATRICIA TURCATTO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como  
parte das exigências para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências, Área: Entomologia

RIBEIRÃO PRETO -SP

2011

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto**  
**Programa de Pós-Graduação em Entomologia**

**“Desenvolvimento e análise do efeito de dietas protéicas  
como suplementação nutricional para abelhas  
*Apis mellifera*”**

**ALINE PATRICIA TURCATTO**

Orientador: Prof. Dr. David de Jong

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como  
parte das exigências para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências, Área: Entomologia

RIBEIRÃO PRETO –SP

2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

TURCATTO, ALINE PATRICIA

Desenvolvimento e análise do efeito de dietas protéicas como suplementação nutricional para abelhas *Apis mellifera*. Aline Patricia Turcatto; Orientador: David de Jong – Ribeirão Preto, 2011.

74p.: 31 il.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Biologia.

1. *Apis mellifera*. 2. Dietas artificiais. 3. Suplementação nutricional.  
4. Abelhas Africanizada. 5. Alimentação artificial

**Dedico,**

Aos meus pais, **Rita e Devanir,**  
Pelo carinho e compreensão sempre,  
Pelas palavras de incentivo em todos os momentos,  
Pelo amor incondicional,  
Por acreditar em mim sempre,  
Enfim por tudo de bom que sou  
Seria impossível sem vocês,  
**EU AMO VOCÊS!**

O caminho desta pesquisa foi trilhado na partilha com muitas pessoas que contribuíram para sua realização, direta ou indiretamente. A todas elas, o meu agradecimento.

**Agradeço,**

À **Deus** por ter me permitido a vida,

Meu irmão **Daniel**, pelo carinho e amor, é muito bom ter um irmão, é muito bom ter você como meu irmão, fazendo parte da minha vida.... Te amo!

Ao meu esposo **André**, meu amor pelo respeito e incentivo, por escolher trilhar junto comigo esse caminho, e toda sua família que me acolheu com tanto carinho. Te amo meu amor!

Ao **Prof. Dr. David de Jong**, pela orientação, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com as abelhas, pela confiança e pelos ensinamentos.

Agradeço aos principais responsáveis pela minha paixão as abelhas *Apis mellifera*, meus queridos amigos:

**Rogério Ap. Pereira**, você não existe! Adoro você!

**Gesline F. Almeida**, pela sua bondade e carinho sempre!

**Tiago M. Francoy**, meu amigo, que esta sempre disposto a me aconselhar e ajudar.

**Michelle Manfrini Moraes**, obrigada, pelo carinho, por sua alegria contagiante, é maravilhoso conviver com você e principalmente muito obrigada por cuidar de mim, independente dos caminhos que a vida siga, você será uma amiga especial, companheira, pra vida toda!

A minha querida amiga **Joyce Volpini de Almeida**, pelos ótimos momentos juntas, pelas risadas, e por estar ao meu lado sempre com tanto carinho e amor, não seria a mesma coisa sem você!

Ao meu querido amigo **Fabricio Alaor Cappelari**, pelas risadas e bons momentos, pelo apoio e dedicação sempre.

A fubazada (amigos do Apilab): **Clycie, Daiana, Mateus, Hipólito, Diego** por todos os momentos de alegria, é muito bom trabalhar com vocês!

A **Profa. Dra. Rosana de Almeida**, por me motivar e apresentar coisas fascinantes sobre o mundo das abelhas.

Aos Professores **Lionel Segui Gonçalves, Ademilson E.E. Soares e Zilá L. P. Simões** pelo convívio, pelas excelentes conversas, ensinamentos e apoio sempre.

A secretaria do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, **Renata Andrade Cavallari**, pela amizade paciência e carinho, e pela ajuda em todos os momentos.

A todos colegas do bloco A, em especial **Mauro e Ana Rita** tracajás, **Juliana, Marcela, Vanessa, Karina e Vera** pela ajuda e atenção sempre, que foram de fundamental importância desse trabalho.

Aos técnicos **Sr. Pedro e Luis Roberto** pelo apoio sempre.

A minha **tia Sara**, minha inspiração desde criança, você é muito especial! Te amo!

Ao **CNPq** e FAPESP, pelo suporte financeiro;

Ao **Departamento de Biologia** da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto;

Ao **Departamento de Genética** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

**Camarada D'água**  
O Teatro Mágico

Camarada d'onde vem essa febre  
Nossa alegria breve, por enquanto nos deixou...  
Camarada viva a vida mais leve  
Não deixe que ela escorregue  
Que te cause mais dor

Caixa d'água guarda a água do dia  
Não cabe tua alegria  
Não basta pro teu calor  
Viva a tua maneira  
Não perca a estribeira  
Saiba do teu valor

E amanheça brilhando mais forte  
Que a estrela do norte  
Que a noite entregou!

Camarada d'água  
Fique peixe de manhã, de madrugada  
Fique toda hora que for

Camarada d'água  
Fique peixe de manhã, de madrugada  
Fique toda hora que for... e não for

"Você é riacho e acho que teu rio vai pra longe do meu mar...  
mar marvado seria o rio  
que correndo do meu riacho... levaria ao que acho  
pra onde ninguém pode achar..."

Como pode um peixe vivo  
Viver fora d'água fria  
Como pode um peixe vivo

Viver fora d'água fria  
Como poderei viver  
Como poderei viver  
Sem a tua, Sem a tua, sem a tua  
Companhia?  
Sem a tua, Sem a tua, sem a tua  
Companhia?



## RESUMO

### “Desenvolvimento e análise do efeito de dietas protéicas como suplementação nutricional para abelhas *Apis mellifera*”

As abelhas, assim como outros insetos necessitam de nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento, manutenção das crias e crescimento da colônia, e essas exigências nutricionais normalmente são supridas pela coleta de néctar, pólen e água. O néctar coletado pelas forrageadoras é a principal fonte de carboidratos, o pólen é a fonte natural de proteínas, vitaminas, minerais e também a fonte de lipídeos. As abelhas necessitam de aminoácidos essenciais para o seu bom desenvolvimento, e as abelhas obtêm esses aminoácidos essenciais através do consumo de pólen. A falta desses aminoácidos na dieta das abelhas pode levar ao enfraquecimento da colônia.

Atualmente em algumas regiões, a carência de pólen tem se tornado um grande problema, pois a apicultura por ser uma atividade dependente dos recursos naturais, apresenta oscilação de produção de acordo com as condições climáticas e ambientais de cada região e a coleta de alimento fica dificultada em épocas de pouca disponibilidade de alimento, onde a carência de pólen pode ocorrer em qualquer época do ano e tal fato acaba por afetar o desenvolvimento da colméia, sendo assim, um bom suplemento deve ser coletado e depois de ingerido deve disponibilizar os elementos nutricionais essenciais para o crescimento, desenvolvimento das colônias, longevidade e boa capacidade produtiva. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e testar dietas artificiais como suplementos protéicos para colônias de abelhas *Apis mellifera*, utilizando ingredientes de fácil e preço acessíveis.

Os experimentos foram realizados no Apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. O primeiro passo consistiu em determinar a concentração protéica na hemolinfa de abelhas operárias em colônias no campo durante os primeiros trinta dias de vida adulta (durante o verão e o inverno) para assim tentarmos correlacionar a concentração protéica à disponibilidade de alimento, foram utilizados quadros com abelhas prestes a emergir e colocados em estufa a 30°C e 70% de umidade relativa e a cada três dias foi coletado

hemolinfa de aproximadamente 30 operárias marcadas. A coleta era feita por meio de um corte na base o que permitiu a coleta da hemolinfa através de pipetas. A concentração protéica das amostras de hemolinfa foi determinada posteriormente pelo método de Bradford (1976). A concentração de proteína das abelhas coletadas no inverno foram mais baixa 6,06  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  – média de todas as idades), em relação às operárias que foram significante menor (média de 6.06  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  – incluindo todos os grupos) em relação as abelhas coletadas durante o verão (14.64  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

O valor nutricional dos dietas suplementares foram analisadas nas abelhas adultas que foram alimentadas em gaiolas nos dias 0(abelhas recém-emergidas) e no dia 7 era feita a coleta de hemolinfa em 10 abelhas de cada tratamento, e a concentração na proteína era quantificada posteriormente. Dessas dietas elaboradas verificamos que (T<sub>1</sub> à base de farelo de soja, farelo de arroz, levedura de cana-de-açúcar, açúcar e água; T<sub>2</sub> à base de quinua, açúcar e mel; T<sub>3</sub> à base de farelo de soja, farinha de milho, açúcar e mel; T<sub>4</sub> à base de farelo de soja, lentilha, açúcar e água; e T<sub>5</sub> à base de farelo de soja, farelo de arroz, levedura de cana-de-açúcar e mel) não apresentaram diferença estatística em relação à controle positivo(abelhas alimentadas com o bee bread) (P>0,05), e encontramos que todas as dietas com exceção do controle negativo(abelhas alimentadas com xarope de açúcar em água) apresentaram diferença estatística significante em relação ao nível de proteína encontrado nas abelhas recém-nascidas(dia 0) (P=0,036).

No segundo experimento foram testadas mais três dietas no laboratório: D<sub>1</sub> (à base de albumina, extrato de soja, açúcar e água) não apresentou diferença estatística significante (p>0,05) em relação ao controle positivo. Já para a outra dieta testada (dieta D<sub>2</sub> à base de levedo de cerveja, leite de soja, farelo de arroz e açúcar e água), por sua vez, apresentou diferença estatística significativamente menor que a controle positivo (p=0,027). Em relação ao nível de proteína nas abelhas recém-nascidas, as dietas D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> controle positivo apresentaram uma diferença estatística significante (P=<0,001). A dieta D<sub>3</sub> base de fubá, apresentou diferença estatística significante em relação ao controle negativo e não apresentou diferença estatística significante em relação às abelhas recém-nascidas (P=<0,001). Mostrando não ser uma dieta eficiente com suplemento protéico para as abelhas.

Depois de testar a eficiência das dietas em laboratório em relação ao nível de proteína na hemolinfa, resolvemos avaliar a taxa de sobrevivência de abelhas confinadas em gaiolas em laboratório durante 22 dias, alimentadas com diferentes dietas: bee bread, xarope de açúcar em água e a dieta D<sub>2</sub>) foram utilizadas recém emergidas de uma mesma colônia, e a cada dia do experimento eram contadas as abelhas mortas dentro de cada gaiola, os resultados mostraram que o controle positivo e a dieta D<sub>2</sub> apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle negativo ( $p > 0,05$ ). Concluímos que tanto as abelhas alimentadas com a dieta D<sub>2</sub> ou com bee bread (controle positivo) sobrevivem mais tempo do que as abelhas alimentadas apenas com xarope.

As dietas que apresentaram melhor desempenho nos testes em laboratório (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>) foram levadas para serem testadas no campo, o consumo das dietas pelas colônias, aumento na produtividade (monitoramento do peso diário e mapeamento da área de cria), foram os parâmetros utilizados. Das colônias controle, ou seja, não receberam nenhum tipo de alimentação suplementar, a colônia n° 7, enxameou completamente (abandono) e a colônia n° 8 apresentou declínio na quantidade da área de cria, mas conseguiu se recuperar, e as colônias n° 13 e n° 14 apresentaram um declínio na área de cria durante os 45 dias de experimento.

As colônias (n° 1 e n° 2) alimentadas com a dieta T<sub>1</sub> foram as que mais consumiram a dieta oferecida e ambas as colônias tiveram um aumento significativo das áreas de crias e devido ao aumento de indivíduos sofreram uma exameação reprodutiva. As colônias n°5 e n°6 foram alimentadas com a dieta T<sub>3</sub>, apresentaram uma melhora significativa em relação à quantidade de cria e aumento no peso. A dieta menos consumida e que apresentou o menor desempenho nas colônias do campo foi a dieta T<sub>2</sub> sendo que a colônia n° 3 enxameou por abandono e a colônia n°4 apresentou um decréscimo na área de cria. As colônias alimentadas com a dieta D<sub>1</sub> (colônia n° 9 e n°10) apresentaram um aumento na área de cria e aumento do peso durante os 45 dias de experimento, e as colônias alimentadas com a dieta D<sub>2</sub> (colônia n°11 e 12) também apresentaram crescente aumento na área de cria e no peso, Concluímos então que todas as dietas testadas no campo com exceção da dieta T<sub>2</sub>, são dietas eficientes como suplemento protéico para colônias em períodos de escassez

## ABSTRACT

### **“Development and analysis of the effect of protein diets as nutritional supplements for honey bees (*Apis mellifera*)”**

Bees need nutrients for development, brood rearing and colony growth. Their nutritional necessities normally are provided by nectar, their principal carbohydrate source, and pollen, which supplies proteins, vitamins, minerals and lipids. Pollen contains the essential amino acids that the bees need for development; a lack of these amino acids in the bee diet can lead to weakening of the colony.

Currently, in some regions, a lack of pollen has become a serious problem, negatively affecting the development of the colony. Beekeepers can provide a pollen substitute to take care of the bees' nutritional necessities; an adequate protein source is essential for colony growth and development, worker longevity and good productive capacity. Our objective was to develop and test artificial diets, made with easily obtained and inexpensive ingredients, as protein supplements for colonies of *Apis mellifera*.

The experiments were conducted at the research apiary of the Genetics Department of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo. The first step consisted of measuring the protein levels in the hemolymph of bees during the first 30 days of adult life (during summer and winter), in order to determine how protein levels correlate with food availability. Newly emerged worker bees were placed in cages in an incubator maintained at 30°C and 70% relative humidity. Hemolymph was collected from samples of bees every three days, from 0 to 30 days; the protein concentration in the hemolymph was measured with the Bradford method. The protein concentration in the bees collected during winter was significantly lower (mean of 6.06 µg/µl – including all age groups) than in the bees collected during the summer (14.64 µg/µl).

The nutritional value of the pollen substitute diets was investigated in adult bees reared on these diets in cages from zero to seven days of age. Hemolymph was collected from 10 bees for each diet at zero days (recently emerged) and after seven

days. The protein concentration in the hemolymph was measured as before. Among the diets, T<sub>1</sub> (soy meal, rice meal, sugar cane yeast, sucrose and water), T<sub>2</sub> (quinua, sucrose and honey), T<sub>3</sub> (soy meal, corn meal, sucrose and honey), T<sub>4</sub> (soy meal, ground lentils, and sucrose), and T<sub>5</sub> (soy meal, rice meal, sugar cane yeast and honey) gave protein levels that were not significantly different those provided by the positive control (bee bread) ( $P>0.05$ ). All of the diets, except the negative control (sucrose), significantly improved the protein levels in the bees fed for seven days compared with the levels in the newly emerged bees. ( $P=0.036$ ).

In a second trial, three more diets were tested. Diet D<sub>1</sub> (made from albumin, soybean extract and sucrose) did not give significantly different protein levels compared to the positive control ( $p>0.05$ ), demonstrating that it was nutritionally adequate. However, diet D<sub>2</sub> (brewers yeast, soy milk, rice meal and sucrose) gave significantly lower protein levels than the positive control ( $p=0,027$ ). Diets D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> and the positive control significantly improved protein levels compared to those in the newly emerged bees ( $P=<0.001$ ). Diet D<sub>3</sub>, made from corn meal, was significantly better than the negative control (sucrose), but it did not significantly increase the protein levels in the hemolymph compared to the levels in the newly emerged bees, demonstrating that it is not a suitable pollen substitute for honey bee nutrition.

We also examined the survivorship of bees maintained in cages during 22 days on various of the protein diets. The diets that were tested were bee bread, sucrose and diet D<sub>2</sub>. Bees reared on D<sub>2</sub> and on bee bread survived significantly longer than those fed on sucrose alone ( $p<0.05$ ).

The diets that gave the best results in the laboratory (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub>) were also tested in field colonies. Diet consumption by the colonies and colony production parameters (weight of the hive and brood area) were compared during 45 days. Among the control colonies (no supplemental feeding), colony no. 7 absconded and colony no. 8 had a decline in brood area at 30 days, though it recovered to the original levels by day 45. The other two negative control colonies, no. 13 and 14, had a decline in brood area.

Colonies 1 and 2, which were fed with diet T<sub>1</sub> had the greatest diet consumption and there was a significant increase in brood area; both colonies produced reproductive

swarms. Colonies 5 and 6, which were fed on diet T<sub>3</sub>, had significantly increased colony weight and increased brood area. The diet that was least consumed and that gave the poorest colony performance was diet T<sub>2</sub>; colony no. 3, fed on this diet absconded, while colony no. 4 had a decrease in brood area. The colonies fed on diets D<sub>1</sub> (no. 9 and 10) and D<sub>2</sub> (no. 11 and 12) had increased colony weight and brood area. We concluded that all of the diets tested in the field, except for diet T<sub>2</sub>, were efficient as protein supplements and would be useful for feeding colonies during dearth periods.

## ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iv
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Exigências nutricionais das abelhas <i>Apis mellifera</i> .....	2
1.2 Importância do uso de dietas artificiais para suplementação alimentar.....	6
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
3.1 Local de estudo e escolha do material.....	15
3.2 Determinação da concentração de proteína na hemolinfa de operárias adultas em colônias do campo durante o verão e o inverno.....	15
3.3 Determinação da eficiência de dietas protéicas como suplementos para abelhas africanizadas mantidas em laboratório .....	17
3.3.1 Procedimento experimental e Preparo das dietas .....	17
3.3.2 Análise do efeito das diferentes dietas sobre a concentração de proteínas na hemolinfa de abelhas adultas confinadas em gaiolas .....	22
3.3.3 Avaliação da taxa de sobrevivência de abelhas operárias adultas confinadas.....	23
3.4 Determinação da eficiência de dietas protéicas em colônias de abelhas africanizadas no campo .....	23
3.4.1- Monitoramento dos pesos das colônias.....	24
3.4.2- Mapeamento da área de cria .....	26
3.5 Análise Estatística .....	26

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
4.1 – Determinação da concentração de proteína na hemolinfa de operárias adultas durante o verão e inverno. ....	28
4.2 - Determinação da eficiência de dietas protéicas como suplementos para abelhas africanizadas mantidas em laboratório .....	30
4.3 - Avaliação da taxa de sobrevivência de abelhas operárias adultas confinadas alimentadas com diferentes dietas .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.4 - Determinação da eficiência de dietas protéicas em colônias de abelhas africanizadas no campo através do monitoramento dos pesos e mapeamento da área de cria das colônias .....	40
<b>5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>62</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>66</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Exigências nutricionais das abelhas *Apis mellifera*

As abelhas *Apis mellifera* são insetos de grande importância ecológica e econômica, e dessa maneira, esse fato tem gerado intensos estudos de investigação sobre suas exigências nutricionais, tipos de alimentos coletados e armazenados pelas colônias e a influência da alimentação artificial na colônia (Crailsheim, 1990). Além disso, esses estudos têm recebido considerável atenção desde que a saúde das colônias de abelhas tem sido influenciada pela pouca disponibilidade de alimentos na natureza (Someville, 2005). A capacidade produtiva e reprodutiva destes insetos está relacionada com a eficiência nutricional (Couto, 1998), e embora o fornecimento de alimento energético estimule a produção de cria, o pólen limita este crescimento e seu efeito nutricional afeta a capacidade da colônia em cuidar das crias mais novas (Cremones 2001).

DeGroot (1953) relatou a importância de aminoácidos no crescimento e desenvolvimento das abelhas, e Haydak (1970) revisou extensivamente as exigências nutricionais na dieta das abelhas. Dessa maneira, esses conhecimentos permitiram a formulação de dietas especiais para auxiliar na nutrição dessas colônias em períodos de escassez de alimentos na natureza, já que atualmente há um decréscimo das paisagens, e em contrapartida o surgimento das monoculturas. Este fato afeta cada vez mais a falta de variedades de fonte nutricionais para as abelhas. (Brodschneider and Crailsheim, 2010).

As abelhas são consideradas muitas vezes como super-organismos (Seeley, 1989) e, portanto, a nutrição desses deve ser investigada sob três níveis (nutrição da colônia, nutrição larval e nutrição dos adultos) com crescente complexidade, pois os distúrbios nos estágios anteriores afetam as fases subsequentes, e vice-versa. Baixos estoques de pólen na colônia podem impedir o bom desenvolvimento das larvas e adultos.

Assim, a qualidade ou o número de adultos na próxima geração pode ser ruim, o que poderia afetar o estado nutricional da colônia e, portanto, influenciar a criação da ninhada posterior. Em uma colônia, os níveis nutricionais estão intimamente ligados através de numerosas interações entre os indivíduos adultos,

e ambas são altamente dependentes de estoques de produtos da colônia e as abelhas adultas podem adaptar suas estratégias de forrageamento ou cuidados com as crias de acordo com as necessidades nutricionais da colônia. (Crailsheim, 1991, 1998).

As abelhas operárias executam diferentes tarefas durante o estágio adulto, de acordo com a idade e os requerimentos da colônia e, portanto, as exigências nutricionais de operárias, rainha e zangões diferem um pouco, de acordo com necessidades fisiológicas, assim como as funções que cada um desempenha dentro da colônia. Uma colônia saudável não é apenas uma colônia que consegue resistir a doenças apenas, mas uma colônia que consegue gerar indivíduos bem nutridos capazes de realizar suas tarefas e produzir descendentes saudáveis (Brodschneider and Crailsheim, 2010).

As abelhas, assim como outros insetos necessitam de nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento, manutenção das crias e crescimento da colônia, e essas exigências nutricionais normalmente são supridas pela coleta de néctar, pólen e água (Herbert, 1992).

O néctar coletado pelas forrageadoras é a principal fonte de carboidratos para as abelhas. Este é coletado nos nectários florais, depois transportado para a colméia onde é armazenado nos favos, e depois de passar por processos físicos e químicos é transformado em mel. As operárias adultas são fortemente dependentes das reservas de carboidratos na colônia, e não sobrevivem a longos períodos sem esse tipo de alimentação, já que estas ao contrário de larvas jovens, não possuem reservas em seus corpos (Hrassnigg and Crailsheim, 2005). Abelhas adultas possuem baixos níveis de glicogênio, e quando necessitam de energia para atividades de vôo, por exemplo, buscam essa energia nas reservas de mel dentro da colônia.

Alguns carboidratos podem ser utilizados pelas abelhas como: glicose, frutose, maltose, sacarose, trealose e melezitose, mas outros carboidratos como: xilose, galactose, lactose, melibiose, manose, rafinose e arabinose são tóxicos para as abelhas (Barker and Lehner, 1974; Barker, 1977). Para a maioria dos insetos, assim como para as abelhas, o carboidrato presente em uma dieta funciona como um fagoestimulante. Sendo assim, segundo Zucoloto, 1994, uma dieta com carboidratos será ingerida em maior quantidade pelas abelhas.

O pólen é a fonte natural de proteínas, mas também é a fonte de lipídeos, vitaminas e minerais para as abelhas (Herbert and Shimanuki, 1978). As abelhas não armazenam pólen em grandes quantidades na colméia como o mel, dessa forma, os estoques diminuem rápido em períodos de pouco forrageamento ou falta de flores na natureza (Schmickl and Crailsheim, 2002). O crescimento e a manutenção das colônias são limitados pela quantidade de proteína disponível (Amdam and Omholt, 2002) e a longevidade, a quantidade de cria e a produção de mel são reduzidas quando o consumo de proteína é inadequado (Herbert and Shimanuki, 1978; Winston *et al.*, 1983; Mattila and Ottis, 2006).

Colônias que têm acesso limitado ao pólen têm uma capacidade reduzida para produzir crias futuras, com um declínio populacional rápido e, eventualmente, a morte da colônia (Mattila and Otis, 2006). O fornecimento de suplementos artificiais e uma fonte alternativa de proteínas artificiais é uma alternativa viável para permitir o desenvolvimento, manutenção e multiplicação das colônias (Herbert, 1992).

O requerimento anual de pólen por uma colônia varia consideravelmente dependendo da localização e tamanho da mesma e também das fontes florais do local. Muitos fatores como a temperatura do ar, o pH e a fertilidade do solo também afetam o valor nutritivo do pólen.

Na colônia, as abelhas misturam o pólen coletado com um pouco de néctar regurgitado, algumas secreções e Vásquez e Olofsson (2009) sugeriram que as bactérias presentes no estômago de mel das abelhas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estejam envolvidas no processo de fermentação do pólen, e podem ser responsáveis pela melhoria do valor nutritivo de pólen através da produção de vitaminas. O pão de abelha ou beebread é diferente do pólen coletado, pois depois dessa fermentação, o pólen passa a ter um pH mais baixo e uma menor concentração de amido (Ellis and Hayes, 2009).

Todos os animais necessitam de aminoácidos essenciais para o seu bom desenvolvimento, e as abelhas obtêm esses aminoácidos essenciais através do consumo de pólen. E Como nem todos os polens são nutricionalmente iguais, em geral as abelhas coletam vários tipos de pólen, pois a quantidade de proteínas do pólen pode variar entre 2,5 e 61%, (Roulston *et al.*, 2000), sendo que alguns polens podem ser deficientes nos dez aminoácidos essenciais para as abelhas:

arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, valina, metionina, fenilalanina, treonina e triptofano (De Groot, 1953; Cremonez, 1996). A falta desses aminoácidos na dieta das abelhas pode levar ao enfraquecimento da colônia. Esta grande variação na composição química tem como consequência diferentes efeitos na fisiologia das abelhas (Cremonez, 2001).

Durante os seis primeiros dias de vida adulta, as abelhas consomem grandes quantidades de pólen para obter as proteínas e aminoácidos necessários para completar seu crescimento e desenvolvimento (além das proteínas e aminoácido, o pólen também fornece as quantidades necessárias de vitaminas e sais minerais para o bom desenvolvimento de uma abelha). Essas abelhas jovens denominadas nutrizas, têm a função de alimentar a cria, através de uma secreção das glândulas hipofaríngeas, que compõe parte da geléia real, que é o alimento fornecido às crias, a rainha e aos zangões (Crailsheim, 1990, 1991)

Entre o 5º e 15º dias, ocorre a grande síntese de proteínas no corpo gorduroso, principalmente de vitelogenina (Engels *et al.* 1990). Nas operárias mais velhas, diminui o requerimento de pólen e aumenta o requerimento de carboidratos, pois necessitam de energia para atividades de vôo, por exemplo (Crailsheim, 1990).

Nas épocas de carência, as reservas de pólen nos favos e reservas de proteína nas abelhas logo são gastos de modo que pólen ou substitutos de pólen são necessários para manter colônias fortes para a polinização ou para a produção de mel. Uma alimentação suplementar pode suprir as exigências de vitaminas e minerais de colônias durante os períodos de escassez, mas os níveis corretos desses nutrientes na dieta ainda são pouco conhecidos (Haydak, 1970).

Quando as abelhas nutrizas começam a produzir geléia real para alimentar as larvas jovens e rainha, elas necessitam de um dieta rica em proteínas e vitaminas, como as do complexo B, tiamina, ácido pantotênico, riboflavina, nicotinamida, ácido fólico e biotina. Além dessas vitaminas, o ácido ascórbico (vitamina C) tem papel fundamental no crescimento das larvas. Microorganismos presentes naturalmente no canal digestório das abelhas podem fornecer vitaminas e outras substâncias essenciais (Brodschneider and Crailsheim, 2010). Alguns mineirais como: sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloro, fósforo, cobre, iodo,

manganês, cobalto, zinco e níquel são necessários às abelhas, e também são extraídos do pólen.

As abelhas obtêm lipídeos exclusivamente do pólen, e o índice de lipídeos do pólen pode variar entre as espécies (0.8% e 18.9%) (Roulston and Cane, 2000). A importância dos lipídeos como atrativos vem sendo muito estudados, e os óleos são adicionados freqüentemente às dietas artificiais. Foi observado que houve aumento da área de cria, quando 2-4% de extratos dos lipídeos do pólen foram adicionados à dieta. Os lipídeos são metabolizados pelas abelhas principalmente durante o estágio de larva, e considerados como uma fonte de energia importante. Os esteróides do pólen são essenciais às abelhas. Foi demonstrado que as dietas que contêm 0.1% de colesterol auxiliam no aumento na área de cria de colônias (Herbert *et al.*, 1980a).

A água é um elemento vital para a vida das abelhas, tanto nos processos fisiológicos de digestão e metabolismo, como para manter a temperatura e umidade relativa da colônia. O consumo de água pela colônia varia de acordo com o tamanho e a localização da colônia (Herbert, 1992)

Portanto, uma alimentação balanceada e adequada é a base para o desenvolvimento e crescimento de uma colônia.

## **1.2 Importância do uso de dietas artificiais para suplementação alimentar**

Atualmente no Brasil, devido à grande destruição das áreas verdes para o cultivo principalmente da cana-de-açúcar, em algumas regiões, a carência de pólen tem se tornado um grande problema, pois a apicultura por ser uma atividade dependente dos recursos naturais, apresenta oscilação de produção de acordo com as condições climáticas e ambientais de cada região (Cremonez, 1996).

As operárias selecionam o tipo de alimento a ser coletado (néctar ou pólen) e a quantidade, sendo que no decorrer do dia, elas podem alterar o tipo de coleta para atender às exigências da colméia (Free, 1980). Tal coleta fica dificultada em épocas de pouca disponibilidade de alimento, onde a carência de pólen pode ocorrer em qualquer época do ano e tal fato acaba por afetar o desenvolvimento da colméia (Johansson and Johansson, 1977), sendo, dessa maneira, a alimentação

artificial muito importante nestes casos, tanto para a manutenção da colônia como para o crescimento e multiplicação do número de colméias.

Sendo assim, na ausência de floradas, quando a reserva de alimento na colônia é insuficiente, é aconselhável o fornecimento de alimentação artificial às abelhas (Azevedo-Benitez and Nogueira-Couto, 1998).

Na tentativa de suprir as necessidades nutricionais dessas abelhas no período de escassez, muitos apicultores oferecem vários tipos de alimentos às suas colônias sem se preocuparem com valor nutricional. Um bom exemplo de alimento comumente fornecido é o fubá, que é um alimento com baixo valor protéico, mais é coletado com entusiasmo pelas operárias e levado para as colônias, sendo logo depois descartado pelas abelhas (De Jong, informação pessoal).

Herbert and Shimanuki (1979) definiram substituto de pólen como qualquer material que, quando fornecido às colônias de abelhas, supre as necessidades de pólen por um curto período de tempo. O substituto de pólen segundo a definição deve conter proteínas e também pequenas quantidades de pólen, o que aumenta o valor nutritivo da dieta e age como um atrativo. Se não houver pólen ou um bom substituto do mesmo, o desenvolvimento das crias pode diminuir ou até cessar completamente (Haydak, 1963).

Entretanto, normalmente, os apicultores oferecem substitutos de pólen para as colônias sem os cuidados relativos à formulação da dieta, à deterioração durante o tempo de estocagem, à atratividade para as abelhas e aos custos dos componentes das dietas (Herbert *et al.*, 1977). Dessa maneira, a carência de pólen na natureza pode afetar a produtividade das colônias (principalmente quantidade de cria), bem como a fisiologia das próprias abelhas, já que estas necessitam de alimentos protéicos para o desenvolvimento dos tecidos do corpo e das glândulas, como por exemplo, as glândulas hipofaríngeas (as quais são responsáveis por secretarem a maior parte dos componentes da geléia real) (Cremonez, 2001).

As abelhas necessitam de reservas de alimento suficientes para atender a sua própria alimentação e das crias em desenvolvimento e o enfraquecimento da colônia se inicia quando a rainha diminui sua postura, reduzindo a quantidade de cria e abelhas na colônia (Huang, 2010). Quando as condições ambientais estão extremamente desfavoráveis, a pouca cria existente na colméia pode morrer

devido à fome, surgimento de doenças ou ser eliminada pelas operárias, que consomem parte da cria para saciar a falta de alimento.

Vários materiais têm sido experimentados por apicultores e pesquisadores para serem utilizados na produção de dietas protéicas artificiais para as abelhas, tais como farelo ou farinha de soja, levedura de cana-de-açúcar, farinha láctea, terneron (sucedâneo para bezerro), farelo de trigo, glutenose de milho, farelo de polpa de citros, entre outros (Azevedo-Benitez and Nogueira-Couto, 1998; Couto, 1998; Lengler, 2000; Cremonez *et al.*, 1998; Morais *et al.*, submitted) que podem ser utilizados na produção de dietas protéicas para as abelhas, tentando dessa maneira, evitar o enfraquecimento das colônias (Lengler, 2000; Cremonez, 2001).

Wahl, 1963 comparou o valor nutritivo do pólen, levedura, farinha de soja e leite em pó, e encontrou que misturas com pólen foram mais eficientes para iniciar e manter a produção de cria nessas colônias, a superioridade do pólen foi atribuída a sua maior atratividade pelas abelhas. (Haydak 1967) após estudar trinta fontes protéicas diferentes utilizadas individualmente ou em misturas observou, que a mais eficiente como substituto de pólen foi a mistura de farinha de soja, leite em pó e levedura de cerveja. Sendo que, após alguns estudos, Herbert *et al.*, (1977) mostraram que a quantidade de proteínas em uma dieta adequada para as abelhas é de 23%.

Entretanto, Doull (1980) observou que a alimentação com suplemento de pólen aumenta a produtividade da colônia. Colônias que receberam o suplemento produziram, respectivamente, 38% e 28% de mel a mais por abelha que as colônias que não receberam uma dieta suplementar. Assim, apesar da diversidade da flora apícola no país, devido ao seu tamanho encontramos diversas realidades nutricionais. Como exemplo, no Nordeste brasileiro, durante a estação seca, ocorre uma escassez de pasto apícola e, conseqüentemente, de alimento para as abelhas (Pereira *et al.*, 2006). Por conseguinte, todo ano os apicultores perdem uma grande parte das suas colônias, que abandonam os apiários em busca de novos pastos no período de escassez de alimento (Freitas, 1991; Lima, 1995).

Dessa forma, a falta de recursos para adquirir o alimento e o desconhecimento de produtos que possam ser oferecidos às abelhas são os motivos que impedem a alimentação adequada das colônias no período necessário. O uso de dietas artificiais pode resolver parcialmente esse problema. Contudo,



apesar de várias pesquisas terem sido realizadas visando encontrar um substituto alimentar para as abelhas (Abbas *et al.*, 1995; Cremonez, 1996, 2001; Azevedo-Benitez and Nogueira-Couto, 1998), não existem produtos eficazes de fácil acesso e baixo custo ao produtor, e um dos problemas enfrentados pelos pesquisadores é que, embora alguns substitutos de pólen sejam tão eficientes quanto o pólen, em geral, são menos atrativos. Muitos substitutos de pólen oferecidos às abelhas são adequados à nutrição e podem até ter maior valor nutritivo que o pólen, mas quando as abelhas têm livre escolha entre o pólen natural e o substituto de pólen, elas se alimentam com o pólen natural (Standifer *et al.*, 1973). Várias dietas suplementares (ou seja, aqueles que contêm pólen) têm seu uso estimulado, e já estão disponíveis comercialmente. O pólen é, no entanto, caro e pode transmitir patógenos (De Jong, et al., 2009).

Para se avaliar as dietas substitutivas para o pólen, os critérios hoje utilizados são: a quantidade de alimento consumido e a produção de cria pela colônia. A quantidade de cria produzida pela colônia é um método eficiente de avaliação, uma vez que reflete a qualidade do alimento, pois as crias de abelha *A. mellifera* são completamente dependentes das operárias adultas (abelhas nutrizes) para se alimentar, e um importante componente do alimento larval é uma secreção protéica das glândulas hipofaringeanas (Cremonez, 1998). Esse produto da secreção das glândulas hipofaringeanas acrescido de mel e misturado à secreção leitosa resultante da secreção das glândulas mandibulares, origina a geléia real (Haydak, 1970).

Além do tipo de alimento fornecido como dieta artificial para as abelhas, um problema encontrado pelos apicultores está relacionado ao armazenamento de tais dietas, pois já foi demonstrado que o valor nutricional do alimento diminui com a idade do pólen (Dietz & Stevenson, 1980). A idade do pólen usado para alimentar as abelhas pode influenciar no crescimento e desenvolvimento da colméia, bem como na produção de cria pela rainha (Pernal & Currie, 2000). Operárias alimentadas com pólen seco armazenado por um ano ou mais apresentaram glândulas hipofaringeanas reduzidas em relação às glândulas de operárias alimentadas com pólen fresco, e também colônias alimentadas com dietas compostas de pólen seco armazenado por mais de dois anos apresentaram uma taxa de produção de cria inferior às colônias que foram alimentadas com



pólen fresco. Hagedorn & Moeller (1968) determinaram que operárias recém-emergidas, alimentadas com suplemento de pólen contendo pequenas quantidades de pólen seco ou congelado por um ano, tiveram desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas similar ao desenvolvimento daquelas alimentadas com um “mix” de pólen fresco (Pernal & Currie, 2000). A alimentação artificial resulta em benefícios, pois assegura um desenvolvimento contínuo das colônias em lugares em épocas de escassez de néctar e pólen, além de prepará-los para aproveitar melhor o fluxo de néctar (Freitas and Echazarreta, 2001). As colônias que não tem acesso ao pólen apresentam uma capacidade reduzida no desenvolvimento da cria, declinando rapidamente a população, e eventualmente levando ao desaparecimento da colônia (Mattila and Otis, 2006).

Colônias que apresentam baixa estocagem de pólen podem retardar a idade em que os adultos alimentam as larvas propriamente, ou criam todas as larvas até se transformarem em adultos. Por esta razão, a qualidade ou o número de adultos para a próxima geração pode ser baixo, o qual poderia afetar o estado de nutrição colonial e então influenciar o subsequente crescimento das crias (Brodschneider & Crailsheim, 2010).

Para atender as exigências nutricionais das abelhas, vários tipos de suplementos têm sido elaborados. Entretanto, normalmente, os apicultores oferecem substitutos de pólen para as colônias sem os cuidados relativos à formulação da dieta, à deterioração durante o tempo de estocagem, à atratividade para as abelhas e aos custos dos componentes das dietas (Herbert *et al.*, 1977).

A avaliação de um suplemento pode ser realizada por uma variedade de medidas e observações realizadas: produção total de mel, produção diária de cria, produtividade e longevidade individual das abelhas operárias adultas (Winston *et al.*, 1983). De um modo geral, um bom suplemento deve ser coletado e depois de ingerido deve disponibilizar os elementos nutricionais essenciais para o crescimento, desenvolvimento das colônias, longevidade e boa capacidade produtiva (Herbert & Shimanuki, 1978; Winston *et al.*, 1983). Poucos estudos foram encontrados a respeito da longevidade das abelhas melíferas relacionados ao consumo de diferentes espécies de pólen (com diferentes proteínas e lipídeos) (Manning *et al.*, 2007).

Schmidt *et al.*, 1989 encontraram que a longevidade de abelhas alimentadas com pólen de plantas polinizadas pelo vento foi menor que aquelas alimentadas com dietas a base de açúcar somente (sem proteína), talvez indicando a ausência de pólen atrativo ou componentes tóxicos.

Contudo, a suplementação de alimento na entressafra é uma ferramenta que os apicultores devem utilizar para aumentar suas produções, visto que, ao entrar no período de floração, as colônias estarão com a população de abelhas em um nível produtivo, não necessitando de um período maior de recuperação dos enxames (Pereira *et al.*, 2006).

## 2. OBJETIVOS

No Brasil, a carência de pólen na natureza é um grande problema para a apicultura, em determinadas regiões, devido às monoculturas e ao clima local. Em algumas épocas do ano é necessário suprir as necessidades nutricionais das abelhas através de dietas artificiais que possam substituir o pólen nesses períodos de escassez alimentar.

Dessa forma, visando desenvolver e analisar o efeito dessas dietas protéicas que possam suplementar as exigências nutricionais de abelhas de maneira eficiente, de fácil preparo e com preços acessíveis o presente projeto tem como objetivos principais:

### Testes de Laboratório

- Avaliar e desenvolver diferentes tipos de dietas artificiais que poderão ser usadas como suplementos proteicos, a fim de suprir as necessidades protéicas das abelhas *A. mellifera*, através de informação sobre os componentes dos nutrientes e as necessidades das abelhas.
- Dosar a quantidade de proteínas na hemolinfa de abelhas operárias recém nascidas mantidas em estufas e alimentadas com as diferentes dietas durante sete dias.

### Testes de Campo

- Testar as dietas que apresentaram um bom desempenho nos testes em laboratório nas colônias do campo, no Apiário experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP).
- Avaliar se as dietas estão sendo utilizadas pelas abelhas como suplemento alimentar por meio de métodos como: análise da área de cria através de mapeamentos realizados quinzenalmente, pesagem diária das colônias através de balanças Toledo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de estudo e escolha do material

Os experimentos foram realizados no Apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (figura 1), localizado na região Noroeste do Estado de São Paulo, numa altitude de 621m, a 21° 11' latitude sul e 47° 43' de longitude oeste, com clima tropical úmido (com inverno seco e verão chuvoso) (Gonçalves, 1978).



**Figura 1:** Apiário experimental do Departamento de Genética da FMRP

#### 3.2 Determinação da concentração de proteína na hemolinfa de operárias adultas em colônias do campo durante o verão e o inverno

Este experimento consistiu em determinar a concentração protéica na hemolinfa de abelhas operárias durante os primeiros trinta dias de vida adulta (durante o verão e o inverno) para assim tentarmos correlacionar a concentração protéica à disponibilidade de alimento. Dessa maneira, analisamos a concentração de proteína na hemolinfa de abelhas nos primeiros 30 dias de vida adulta, para determinarmos a variabilidade do teor protéico da hemolinfa em duas épocas do ano: verão (janeiro de 2008) (época de grande disponibilidade de alimento) e inverno (julho de 2008) (época de carência de alimento e baixas t

Para a realização dos experimentos, foram utilizados quadros com abelhas prestes a emergir retirados de recria modelo Langstroth que foram colocados em estufa a 30°C e 70% de umidade relativa. Após aproximadamente 18 horas, 700 operárias recém-emergidas foram marcadas com etiquetas plásticas numeradas e fixadas no tórax (figura 2) de cada abelha e introduzidas em um núcleo contendo quatro quadros e um alimentador. A cada três dias foi coletado um pool de hemolinfa de aproximadamente 30 operárias marcadas.



**Figura 2:** Abelhas marcadas com etiquetas plásticas numeradas inseridas no tórax

A coleta era feita por meio de um corte na base da asa da operária e/ou no abdômen (entre o 2° e 3° tergitos), feito com tesoura de dissecação, o que permitiu a coleta da hemolinfa através de pipetas. Estas amostras de hemolinfa foram centrifugadas a 1500 rpm por 4 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e congelado à -20°C. A concentração protéica das amostras de hemolinfa foi determinada posteriormente pelo método de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovino como padrão. A quantificação das amostras foi realizada por leitura em um comprimento de onda de 595nm em espectrofotômetro Beckman® Coulter DXT-880-multimode detector.

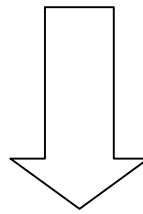
### **3.3 Determinação da eficiência de dietas protéicas como suplementos para abelhas africanizadas mantidas em laboratório**

#### **3.3.1 Procedimento experimental e Preparo das dietas**

Para este experimento, foram utilizados recrias modelo Langstroth, localizadas no apiário experimental. Inicialmente, foram retirados quadros de cria operculados (de uma mesma colônia) e colocados em gaiolas de madeira cobertas por telas de nylon e introduzidas em uma estufa com temperatura e umidade controladas, em torno de 30°C e 70%, para a emergência das operárias. Após a emergência de tais abelhas, amostras de 100 operárias recém-emergidas foram coletadas e introduzidas em gaiolas de confinamento (13 cm x 13 cm x 22 cm) (Figura 3) onde foram alimentadas com diferentes dietas durante sete dias, sendo esse procedimento repetido por três vezes.

As gaiolas foram mantidas em estufa com temperatura e umidade controladas conforme descrito acima. As dietas oferecidas variaram em relação à quantidade de proteína oferecida e também aos produtos utilizados. Aproximadamente 10 gramas de cada dieta foram introduzidos nas gaiolas de confinamento, em um container plástico com abertura frontal a cada dois dias (figura 3). Duas gaiolas de confinamento foram selecionadas como controle positivo (operárias alimentadas com beebread no favo), e controle negativo (operárias alimentadas com xarope em açúcar 70%) para cada experimento.

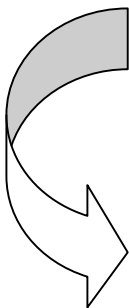




**Figura 3:** a- Gaiola de confinamento para abelhas;s; b- Gaiolas de confinamento com abelhas mantidas em estufa.

As dietas foram preparadas através da mistura de vários ingredientes protéicos, e sempre preparadas em uma consistência firme e pastosa (figura 4).

Sendo que as dietas foram elaboradas com diferentes proporções de vários ingredientes para determinar quais seriam mais eficientes, levando em conta a disponibilidade e o preço destes materiais, para assim tentar desenvolver uma dieta viável para os apicultores. Para estes experimentos foram utilizadas os ingredientes descritos nas tabelas 1 (com os experimentos realizados no inverno) e tabela 2 (experimentos realizados no verão).



**Figura 4:** a -Dieta artificial proteica preparada em consistência pastosa, b- recipiente plástico utilizada para alimentar as abelhas confinadas em gaiolas



**Tabela 1:** Dietas energético-protéicas elaboradas com diferentes ingredientes e fornecidas às operárias de abelhas africanizadas *Apis mellifera*.

DIETAS	INGREDIENTES
<b>Controle positivo</b>	Beebread (pólen armazenado no favo)
<b>Controle negativo</b>	Xarope 70% (açúcar em água)
<b>T<sub>1</sub></b>	30g de soja 10g de farelo arroz 5g de levedura 80 ml de xarope 10g de açúcar
<b>T<sub>2</sub></b>	20g de quinua 30g de açúcar 30g de mel 5 ml de xarope
<b>T<sub>3</sub></b>	15g de farelo de soja 15g de farinha de milho 20g de açúcar 80g de mel
<b>T<sub>4</sub></b>	20g de farelo de soja 10g de lentilha triturada 20g de açúcar 30g de mel 5 ml de água
<b>T<sub>5</sub></b>	15g de farelo de soja 10g de farinha de arroz 5g de levedura 20g de açúcar 30g de mel

**Tabela 2:** Dietas energético-protéicas elaboradas com diferentes ingredientes e fornecidas às operárias de abelhas africanizadas *Apis mellifera*.

DIETAS	INGREDIENTES
<b>Controle positivo</b>	Beebread
<b>Controle negativo</b>	Xarope (açúcar e água)
<b>D<sub>1</sub></b>	30g leite de soja 10g albumina 20g açúcar xarope
<b>D<sub>2</sub></b>	20g levedura cerveja 20g leite de soja 10g farelo de arroz 20g açúcar xarope
<b>D<sub>3</sub></b>	20g de fubá de milho 10g de açúcar xarope

### 3.3.2 Análise do efeito das diferentes dietas sobre a concentração de proteínas na hemolinfa de abelhas adultas confinadas em gaiolas

Após a emergência das operárias, foi coletado um pool de 10 abelhas recém-nascidas, denominadas de grupo (dia 0). Esta coleta servia para efeito comparativo com o grupo que era confinado e recebia alimentação artificial através das dietas desenvolvidas em laboratório. Ao final de 7 dias (grupo denominado dia 7) era coletado a hemolinfa de também um pool de 10 operárias. Tal hemolinfa foi coletada com o auxílio de micro-pipetas introduzidos numa pequena incisão abdominal e/ou corte na base da asa (figura 5) e transferida para tubos de microcentrífuga. Estas amostras de hemolinfa foram centrifugadas à 1500 rpm por 4 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e congelado à -20°C. A quantificação total de proteínas foi realizada pelo método de Bradford, 1976 e a construção da curva padrão foi realizada utilizando albumina sérica bovina (BSA).

A quantificação das amostras foi realizada por leitura em um comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro Beckman® Coulter DXT-880-multimode detector.



**Figura 5:** Hemolinfa de operária sendo coletada com a ajuda de uma micropipeta

### **3.3.3 Avaliação da taxa de sobrevivência de abelhas operárias adultas confinadas**

Para este experimento, avaliamos a taxa de sobrevivência de operárias confinadas em gaiolas e alimentadas com diferentes dietas. Foram utilizadas nove gaiolas de confinamento contendo abelhas recém-nascidas de uma mesma colônia, sendo que três gaiolas foram alimentadas apenas com xarope de açúcar 70% (controle negativo), três alimentadas com beebread no favo (controle positivo) e três gaiolas alimentadas com a dieta artificial protéica D<sub>2</sub>(tabela 2).

As gaiolas foram mantidas em estufa com 30°C e 80% de temperatura e umidade relativa respectivamente. A cada dia do experimento eram contadas as abelhas mortas dentro de cada gaiola e os dados obtidos eram anotados para análise posterior, durante 22 dias.

### **3.4 Determinação da eficiência de dietas protéicas em colônias de abelhas africanizadas no campo**

Após testarmos a eficiência das diferentes dietas e verificarmos a aceitabilidade pelas operárias tratadas em laboratório, passamos para outra fase do experimento. As dietas mais eficazes e de preço acessível, foram utilizadas para alimentar as colônias no campo. Estes testes foram conduzidos com a utilização das cinco melhores dietas elaboradas e testadas em laboratório em dois experimentos distintos.

#### **1º Experimento**

Para esse experimento foram selecionados oito ninhos, dos quais dois foram definidos como grupo controle (não recebendo nenhum tipo de dieta suplementar) e seis ninhos foram escolhidos ao acaso para receberem as dietas. As dietas foram fornecidas em grupos de duas colônias, sendo que durante todo o experimento a cada três dias eram fornecidas 100g de cada dieta às colônias selecionadas. O experimento teve duração de 45 dias.

## 2º Experimento

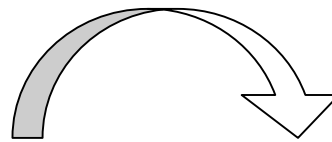
Para tal experimento, iniciamos a suplementação artificial em seis núcleos distintos. Desses núcleos, quatro receberam as dietas artificiais e dois foram selecionados como grupos controle. As dietas foram igualmente fornecidas em grupos de duas colônias a cada três dias. A cada dia era fornecido 100g de cada dieta e os núcleos selecionados como grupos controle não receberam nenhum tipo de suplementação artificial protéica.

### 3.4.1- Monitoramento dos pesos das colônias

Todas as colônias utilizadas neste experimento foram instaladas sobre balanças digitais Toledo dotadas de sensores (figura 6) nas quais controlam o peso das colônias durante todo o dia (Meikle *et al* 2008). Os dados foram monitorados automaticamente e registrados por um computador e dispostos em tabelas para análise (figura 7). O peso diário de cada colônia foi anotado para verificação da eficiência das dietas no crescimento colonial. Cada uma das colônias foi alimentada durante 45 dias para avaliar cada dieta em teste. Foi introduzido 100g de alimento duas vezes na semana e a sobra foi quantificada e anotada para posterior verificação da aceitabilidade das dietas.



**Figura 6:** Ninhos utilizados no experimento de suplementação artificial com dietas protéicas, localizados sobre balanças digitais Toledo.



**Figura 7:** Painéis eletrônico dispostos na parte interna do laboratório, indicando os pesos das balanças que encontram-se localizadas no apiário .

### 3.4.2- Mapeamento da área de cria

Essas dietas foram avaliadas também através do mapeamento da área de cria conforme metodologia adaptada de Al-Tikrity *et al.* (1971). Os mapas foram feitos antes de iniciarmos o fornecimento das dietas e após, 15, 30 e 45 dias. Os quadros com cria de cada ninho foram medidos um a um, quanto à sua área de cria desoperculada e operculada, através de um suporte (por onde são colocados tais quadros) (figura 8) com laterais construídas com arame esticado, formando quadrados de 2 cm de lado (4 cm<sup>2</sup> de área ou 13 células de operárias).



**Figura 8:** Quadro de madeira utilizado para mapeamento dos quadros da colônia.

### 3.5 Análise Estatística

A concentração total de proteína na hemolinfa das abelhas alimentadas com as diferentes dietas foi comparada com o controle positivo, de modo obtermos um parâmetro de comparação da qualidade das dietas. Primeiramente os dados foram testados quanto à sua normalidade ( $\alpha = 0,05$ ) e em seguida, comparados através de um teste ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) no software SigmaStat 3.5.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Determinação da concentração de proteína na hemolinfa de operárias adultas durante o verão e inverno.

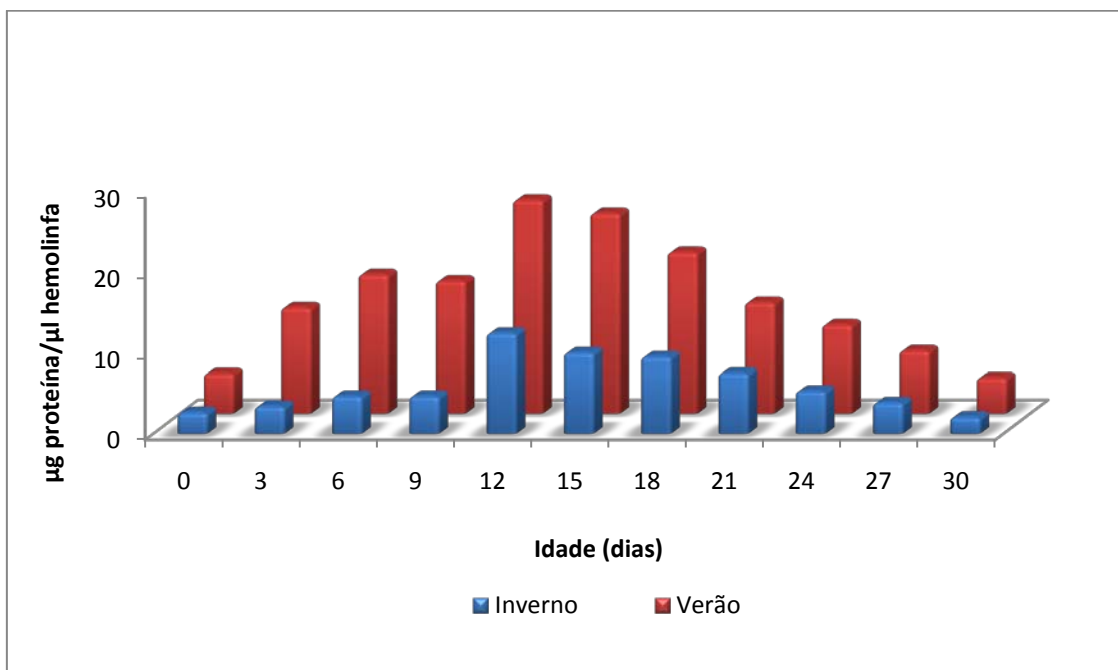
A análise da concentração de proteína na hemolinfa de abelhas operárias em colônias no campo desde a emergência até o 30° dia de vida adulta mostrou que as abelhas que foram coletadas no inverno, independente da idade, apresentaram uma concentração de proteína mais baixa (6,06 µg/µl – média de todas as idades) em relação às operárias que foram coletadas no verão (14,64 µg/µl). Portanto, a concentração média de proteína da amostra coletada no verão foi significativamente maior ( $p=0,002$ ) que a coletada no inverno.

Na primeira amostra, coletada no verão (janeiro/2008), com uma temperatura média de 23,9°C e 37,0 mm de chuva, a concentração protéica de hemolinfa nas abelhas de três dias foi de 13,22 µg/µl. Este valor aumenta até o 12° dia de vida adulta (26,54 µg/µl), e volta a cair a partir daí. No 30° dia, detectamos 4,5 µg/µl de hemolinfa (figura 8).

A segunda amostra, coletada no inverno (julho/2008), com uma temperatura média de 19,8°C e 0,2 mm de chuva, a concentração protéica de hemolinfa nas abelhas de três dias foi de 3,44 µg/µl. Este valor aumenta até 12° dia de vida adulta (12,52 µg/µl) e como da mesma maneira que visualizado na coleta de verão, ocorre um decréscimo de proteína na hemolinfa totalizando um valor de 2,12 µg/µl (figura 9).

O resultado da análise estatística comparando as duas amostras mostrou diferença estatística significativa entre elas ( $p<0001$ ) para todas as idades. Esse trabalho mostrou que podemos afirmar a necessidade de uma alimentação suplementar artificial em períodos de escassez alimentar como nosso caso, o período de inverno.





**Figura 9:** Comparação da concentração protéica na hemolinfa de abelhas operárias africanizadas *Apis mellifera*, desde a emergência até 30º dia de vida adulta em duas estações climáticas (inverno e verão).

Nossos dados corroboram com os dados encontrados por Cremonez, 1996, no qual verificou que comparando duas amostras (verão e inverno), a concentração de proteína na hemolinfa na amostra coletada no verão foi maior que a da amostra coletada no inverno. Dessa forma, verificamos que a redução da oferta de alimento na natureza é refletida na diminuição do título de proteína na hemolinfa das operárias. O alimento armazenado não foi suficiente para permitir que as abelhas alcançassem os títulos normais de proteína observados nas operárias que se desenvolvem em fartura de alimento.

Brandeburgo e Gonçalves (1989) observaram que temperaturas mais baixas provocam diminuição da área de cria. Assim, verificamos que os títulos de proteína total na hemolinfa foi influenciado pelos fatores ambientais, como a temperatura, a umidade relativa e a precipitação de chuvas, já que estes vão determinar a quantidade de alimento disponível na natureza. Entretanto, a maior influência é mesmo a disponibilidade de pólen na natureza e, conseqüentemente, de pólen estocado e utilizado pelas operárias da colônia.

A análise da concentração de proteína na hemolinfa de abelhas operárias recém emergidas (1º dia de vida) apresentou uma concentração protéica baixa no inverno (2,68 µg/µl). No verão, a concentração de proteína é mais alta (5,04 µg/µl), apresentando uma diferença estatística significativa em relação aos dados obtidos no inverno ( $p < 0,001$ ). Estes dados refletem a qualidade do alimento recebido na fase de larva pelas abelhas nutrizas, uma vez que tais abelhas apresentam as glândulas hipofaringeanas altamente desenvolvidas (Knecht & Kaatz, 1990), produzindo a maior parte da geléia real, que é o alimento fornecido a rainha e larvas de operárias da colônia (Crailsheim, 1991).

Nas amostras coletadas durante o verão a partir do 5º dia de vida adulta e até o 12º, ocorre o pico de proteína total na hemolinfa dessas operárias. E a partir do 21º dia de vida, a concentração protéica na hemolinfa das abelhas coletadas em ambos os períodos diminuiu, sendo que no 30º dia de vida esse nível chegou próximo ao das abelhas recém-emergidas. Dessa maneira, pudemos verificar que esta fase coincide com a fase em que o requerimento de proteínas diminui e aumenta o requerimento de carboidratos pelas abelhas, pois estas apresentam intenso metabolismo para vôo (Crailsheim, 1990; Crailsheim et. al, 1992; ). Segundo Gillian e Jakson (1972) as proteínas da hemolinfa de abelhas adultas mais velhas tornam-se estáveis e sem modificações.

#### **4.2 - Determinação da eficiência de dietas protéicas como suplementos para abelhas africanizadas mantidas em laboratório**

##### **1º Experimento**

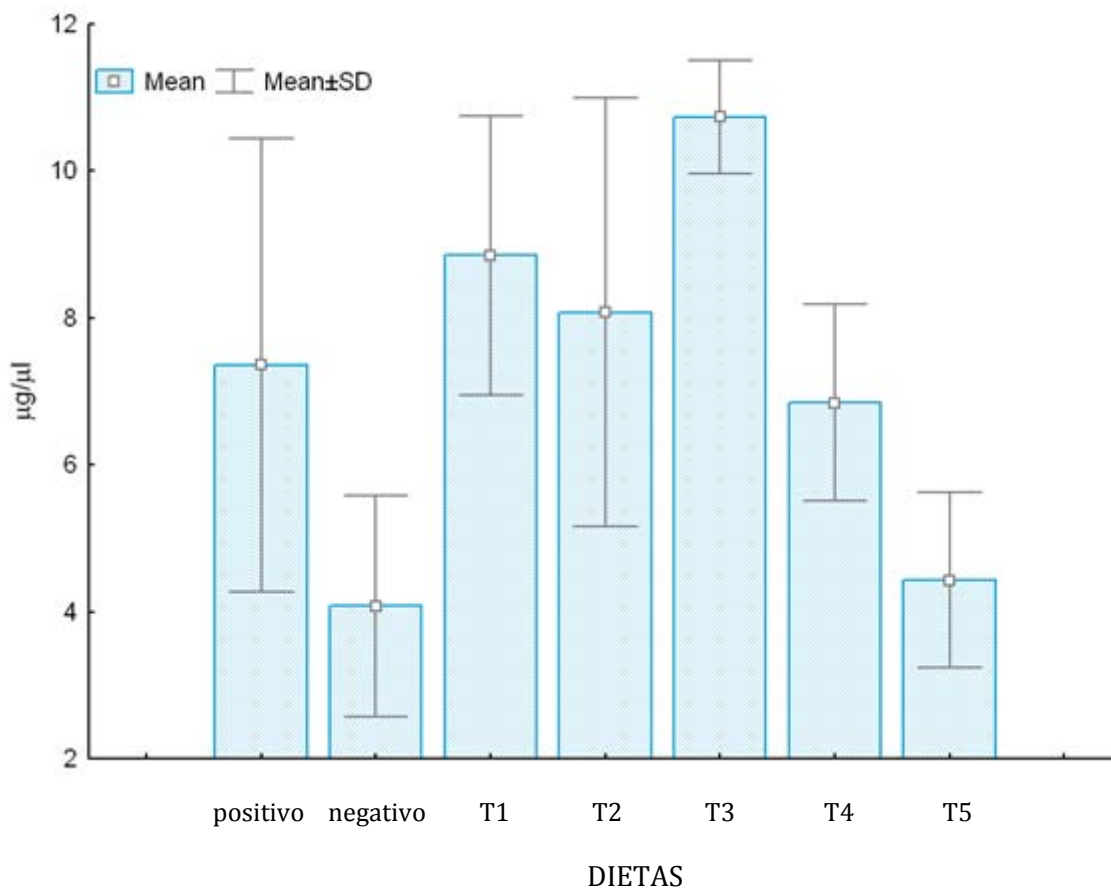
Nesse primeiro experimento foram elaboradas e testadas sete dietas artificiais protéicas (tabela 1), sendo duas dessas, classificadas como controle positivo (bee bread – pólen armazenado no favo) e controle negativo (xarope 70% de açúcar em água).

Todas as dietas oferecidas variaram em relação à quantidade de proteína oferecida e também aos produtos utilizados. Dessas dietas elaboradas verificamos que cinco (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> e T<sub>5</sub>) não apresentaram diferença estatística em relação ao

controle positivo ( $P > 0,05$ ), e uma, a  $T_3$ , apresentou diferença estatística significativamente maior que a controle positivo ( $P = 0,027$ ). A média dos níveis de proteína na hemolinfa ( $\text{mg}/\mu\text{l}$ ) das abelhas alimentadas com diferentes dietas foram respectivamente: controle positivo:  $7,35 \text{ mg}/\mu\text{l}$ ; controle negativo:  $4,07 \text{ mg}/\mu\text{l}$ ; dieta  $T_1$ :  $8,85 \text{ mg}/\mu\text{l}$ ; dieta  $T_2$ :  $8,07 \text{ mg}/\mu\text{l}$ ; dieta  $T_3$ :  $10,73 \text{ mg}/\mu\text{l}$ ;  $T_4$ :  $6,8$  e dieta  $T_5$ :  $4,4$ . E as abelhas recém-emergidas (coletadas ao emergir, antes de receber qualquer tipo de alimentação como adulto) apresentaram o nível de proteína na hemolinfa de  $4,02 \text{ mg}/\mu\text{l}$ . Esse experimento foi realizado no inverno, por isso as baixas concentrações na hemolinfa das abelhas.

A síntese de proteína pelas abelhas é influenciada por muitos fatores, como por exemplo a alimentação, uma vez que desta, provém o material e energia necessários à síntese protéica. Nossos dados mostraram que as dietas artificiais elaboradas por nós ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ ,  $T_4$  e  $T_5$ ), promovem a síntese de proteína em níveis semelhantes aos encontrados em abelhas que consumiram “bee bread” (fonte natural de proteínas para as abelhas).

Assim, encontramos que todas as dietas com exceção do controle negativo apresentaram diferença estatística significante em relação ao nível de proteína encontrado nas abelhas recém-nascidas (dia 0) ( $P = 0,036$ ). Dessa forma, temos 3 dietas artificiais protéicas:  $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_3$  que apresentaram níveis protéicos na hemolinfa superiores em relação aos níveis encontrados nas abelhas alimentadas com pólen armazenado no favo (controle positivo) e, portanto, possíveis boas dietas capazes de suprir as necessidades nutricionais de uma colônia em períodos de escassez alimentar (Figura 10). Este dado se mostra como um resultado surpreendente, pois embora o pólen seja a fonte protéica natural para as abelhas, as dietas artificiais quando utilizadas como suplementação alimentar em períodos de escassez podem manter as colônias fortes pelo período necessário.



**Figura 10:** Média e Desvio Padrão da concentração de proteína total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) na hemolinfa de abelhas operárias *Apis mellifera* confinadas em gaiolas.

As abelhas consomem o pólen após ter sido coletado e fermentado nos favos da colônia, denominado assim de bee bread (Hebert & Shimanuki, 1978). O valor nutricional do bee bread é superior ao pólen coletado pelas abelhas quando comparamos os valores de proteína na hemolinfa dessas abelhas alimentadas com estes materiais (Cremonez *et al* 1998).

Assim, ausência de pólen ou pólen com baixos níveis protéicos produz uma carência a ponto de afetar a síntese de proteínas. Se a fonte muda, ou a disponibilidade aumenta, as abelhas retomam a atividade sintética. Na natureza, a oferta de alimento protéico em seguida a um período de escassez causa a recuperação da vitalidade da colônia, que rapidamente converte o alimento em estoques de pólen e produção de crias, demonstrando a melhora no estado nutricional das abelhas (Cremonez *et al.*, 1998). Portanto, nesses períodos de baixa na disponibilidade de proteína, o fornecimento de dietas alternativas como forma

de suplementação podem ajudar a melhorar o desempenho da colônia até a melhora das condições ambientais (Cremonez, 1996). Em algumas regiões do país, onde existem secas intensas, os apicultores perdem grande parte de suas colônias, e a falta de alimento é um desses fatores responsáveis pelo abandono das colônias.

Para estes experimentos, os dados encontrados por nós diferem dos encontrados por Cremonez, 2001, no qual os títulos mais altos de proteína foram verificados nos grupos de abelhas confinadas que consumiram pólen como fonte alimentar protéica. Da mesma forma que o encontrado por Haydak (1935), que verificou que abelhas alimentadas apenas com carboidratos (controle negativo) apresentam um decréscimo na concentração de proteína na hemolinfa, e sendo assim, a dieta de xarope não permitiu a síntese de proteína total em níveis normais.

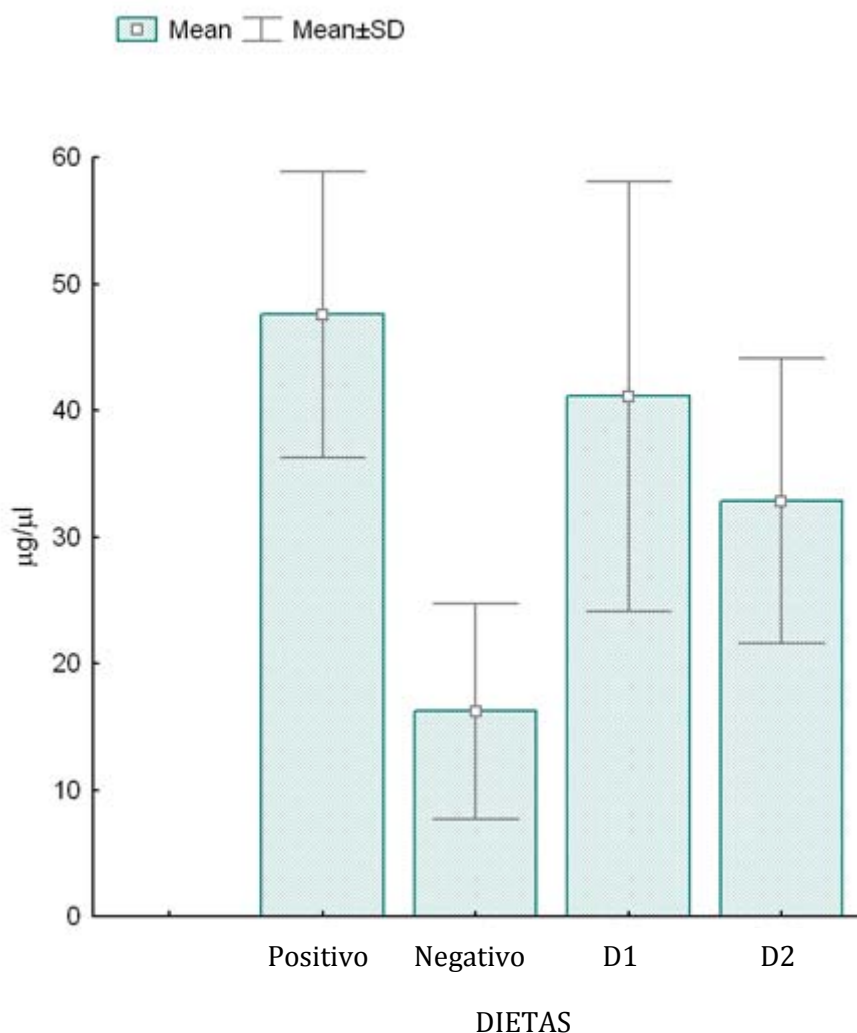
A análise da quantidade de proteína na hemolinfa de operárias confinadas em gaiolas e alimentadas com dietas artificiais, mostrou ser um método eficaz para determinar a eficiência de dietas proteicas como suplementação alimentar em períodos de escassez.

## **2º Experimento**

Nesse segundo experimento, realizado no verão, foram elaboradas e testadas mais cinco diferentes dietas (tabela 2). Da mesma maneira que o experimento anterior, em todos os experimentos duas dietas foram classificadas como: controle positivo (beebread: pólen armazenado no favo) e controle negativo (xarope 70% de açúcar em água) e as três dietas restantes denominadas de D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>, variaram em relação à quantidade de proteína oferecida e também aos produtos utilizados. Ressalta-se que todos os ingredientes utilizados para elaborar cada dieta foram selecionados mediante facilidade para adquiri-lo, menor custo e valor nutricional através de dados obtidos pelo site da Anvisa ([www.anvisa.gov.br/alimentos](http://www.anvisa.gov.br/alimentos)) e tabela Brasileira de Composição dos Alimentos ([www.unicamp.br/nepa/taco](http://www.unicamp.br/nepa/taco)).

Através de tais experimentos testados em laboratório, verificamos que a dieta D<sub>1</sub> não apresentou diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle positivo (realidade nutricional das abelhas), mostrando, dessa maneira,

um bom desempenho nutricional. Já para a outra dieta testada (dieta D<sub>2</sub>), por sua vez, apresentou diferença estatística significativamente menor que a controle positivo ( $p=0,027$ ). A média dos níveis de proteína na hemolinfa ( $\text{mg}/\mu\text{l}$ ) das abelhas alimentadas com diferentes dietas foram respectivamente: controle positivo:  $45,9 \text{ mg}/\mu\text{l}$ ; controle negativo:  $16,9 \text{ mg}/\mu\text{l}$ ; dieta D<sub>1</sub>:  $46,3 \text{ mg}/\mu\text{l}$ ; dieta D<sub>2</sub>:  $32,3 \text{ mg}/\mu\text{l}$ ; (Figura 11), e as abelhas recém-emergidas (coletadas ao emergir, antes de receber qualquer tipo de alimentação como adulto) apresentaram o nível de proteína na hemolinfa de  $21,1 \text{ mg}/\mu\text{l}$ . Em relação ao nível de proteína nas abelhas recém-nascidas, as dietas T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub> e controle positivo apresentaram uma diferença estatística significativa ( $P < 0,001$ ).



**Figura 11:** Média e Desvio Padrão da concentração de proteína total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) na hemolinfa de abelhas operárias *A. mellifera* confinadas em gaiolas

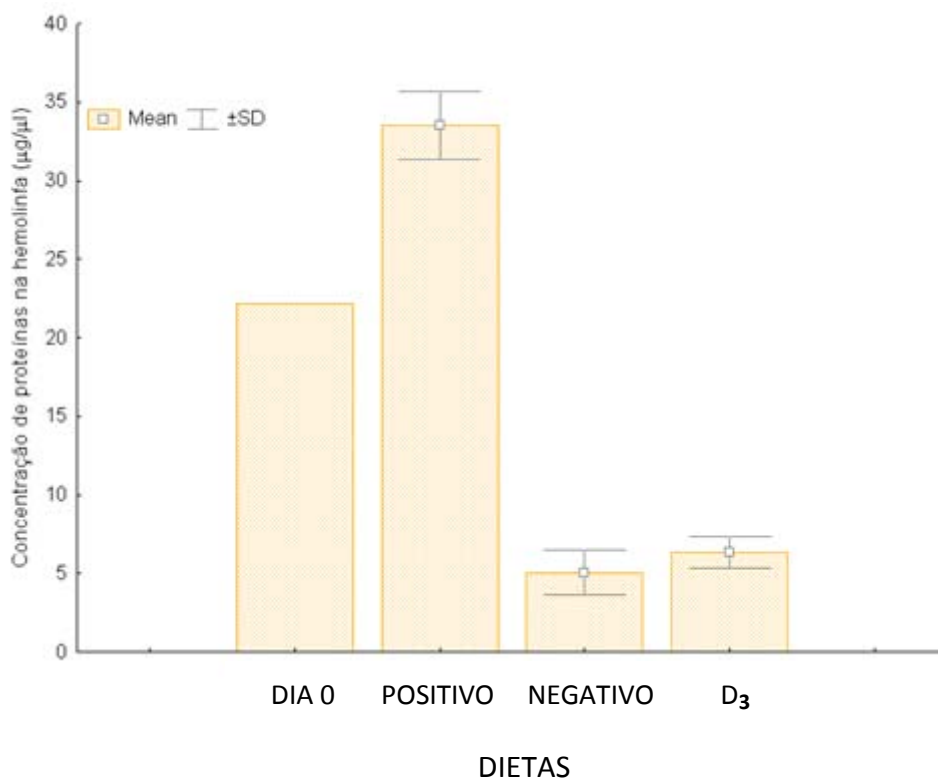
Haydak (1967) encontrou que substitutos de pólen contendo farinha de soja ou levedura de cerveja, enriquecidos com gema de ovo, foram superiores às dietas enriquecidas com pólen coletado por meio de coletores. Nossos dados corroboram com Haydak, uma vez que nossa dieta D<sub>1</sub>, que é uma dieta a base de extrato de soja e albumina (proteína presente ovo) mostrou nível de proteína das abelhas que a consumiram semelhantes ao das abelhas que consumiram o pólen. Apesar de ter apresentado diferença estatística significativa, dieta D<sub>2</sub> apresentou níveis de proteína na hemolinfa próximos aos encontrados nas abelhas alimentadas com bee bread.

Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por van der Steen(2007), que mostrou um aumento progressivo no título da proteína na hemolinfa das abelhas alimentadas com soja ou pólen, e uma redução de proteína foi observada nas abelhas alimentadas com farinha de milho ou sacarose. Como podemos observar as abelhas recém-emergidas apresentavam um nível na proteína na hemolinfa de 21,1 mg/μl, sendo que após sete dias de alimentação nas gaiolas de confinamento o nível de proteína na hemolinfa das abelhas alimentadas com as dietas D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> aumentaram respectivamente para 46,3 mg/μl e 32,3 mg/μl. Certas dietas artificiais ou substitutos de pólen para as abelhas oferecido poderia ter o mesmo valor nutritivo como o pólen ou poderia até mesmo superar em valor nutritivo do pólen (Standifer et al. 1973). Segundo Herbert e Shimanuki 1978, os substitutos de pólen executam eficientemente todas as funções do pólen, mas a principal dificuldade é a aceitação pelas abelhas, pois os substitutos necessitam ser além de nutritivos, palatáveis para as abelhas.

Além disso, também solicitamos aos apicultores, através de revista de grande divulgação científica no meio, que respondessem algumas questões sobre o fornecimento de dietas suplementares e dos ingredientes mais utilizados por eles em suas colônias no campo.

E a dieta D<sub>3</sub> (a base de fubá de milho), por exemplo, foi elaborada através de informações fornecidas por diversos apicultores, que na falta de outras fontes protéicas acessíveis em especial, nos períodos de escassez alimentar na natureza, acabam oferecendo às abelhas tal alimento, que é de fácil acesso, principalmente por apresentarem baixos preços (em todas as regiões do país), mas possuem

baixos valores nutricionais. Nossos resultados mostraram que a dieta a base de fubá, como esperado, apresentou baixos níveis de proteína na hemolinfa dieta D<sub>3</sub>: 6,3 mg/μl, enquanto o controle positivo: 34,2 mg/μl e o controle negativo: 5,1 mg/μl. Portanto a dieta D<sub>3</sub> apresentou diferença estatística em relação ao controle positivo, e não apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle negativo (figura 12).



**Figura 12:** Média e Desvio Padrão da concentração de proteína total (μg/μl) na hemolinfa de abelhas operárias *A. mellifera* confinadas em gaiolas

Sendo assim, D<sub>3</sub> é uma dieta, que depois de testada em laboratório, mostrou não ser eficiente quando utilizada como suplemento alimentar. Nossos dados estão de acordo com os encontrados por Cremonez (1996) que mostraram que o nível de proteína na hemolinfa de operárias alimentadas com dieta a base de fubá não diferem estatisticamente das alimentadas com xarope.

Nossos dados estão de acordo também com os encontrados por Bitondi *et al.*, (1994), que observaram que, nas abelhas alimentadas com dietas com baixo teor proteico, a quantidade de proteína na hemolinfa é baixa. Haydak (1935) observou que em abelhas nutrizas alimentadas com dietas pobres em proteínas ou



apenas com carboidratos, o nível da quantidade de proteína na hemolinfa decresce. Isso corrobora com os dados que encontramos nos testes feitos com abelhas alimentadas com dieta a base de fubá, pois apresentaram um nível proteico na hemolinfa inferior às abelhas alimentadas apenas com carboidratos.

A determinação da concentração de proteína na hemolinfa de operárias, é um método preciso para avaliar a eficiência de dietas ricas em proteínas. Os dados mostram uma grande variabilidade nos títulos de proteína na hemolinfa de abelhas alimentadas com dietas diferentes. O teste de pequenos grupos de abelhas em gaiolas tem várias vantagens, pois os testes são relativamente rápidos, com baixo gastos de materiais e além disso a alimentação das abelhas em gaiolas não sofre interferência de fatores externos.

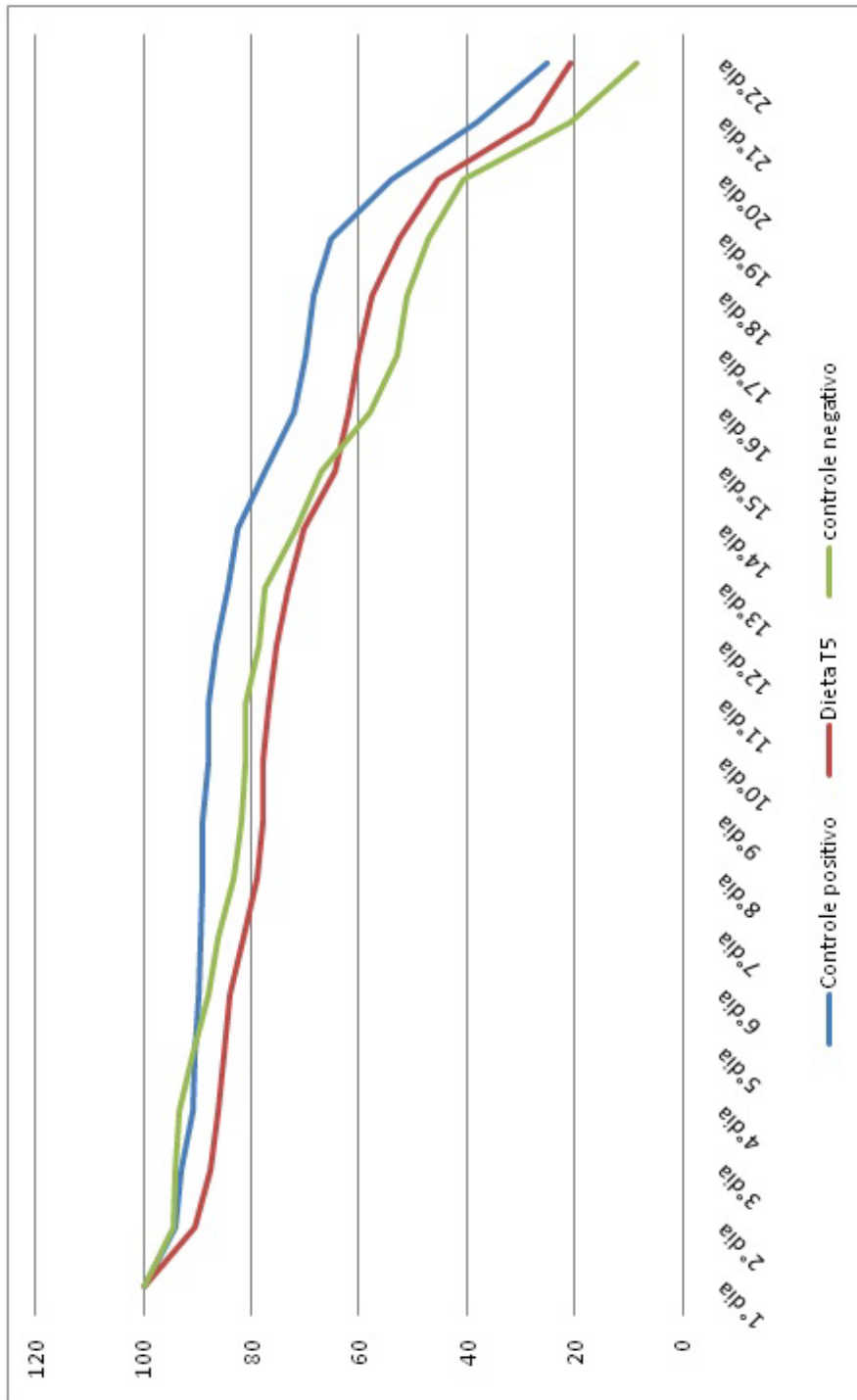
#### **4.3 - Avaliação da taxa de sobrevivência de abelhas operárias adultas confinadas alimentadas com diferentes dietas**

Nesse experimento, verificamos que o controle positivo e a dieta D<sub>2</sub> apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle negativo ( $p > 0,05$ ) e a dieta D<sub>2</sub> (Tabela 2) apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle positivo. Concluímos que, apesar do controle positivo ser o que possui uma maior taxa de sobrevivência, a dieta D<sub>2</sub> pode ser utilizada como alimento suplementar nos períodos de escassez alimentar, pois as abelhas que consumiram essa dieta apresentaram uma taxa de sobrevivência maior do que aquelas abelhas alimentadas somente com xarope (figura 13).

Segundo Haydak (1935) as dietas a base de levedura desidratada oferecem às abelhas bons níveis de proteína e o desenvolvimento normal das glândulas hipofaringeanas.

Estudos de longevidade realizados por Schmidt (1984) mostrou que o baixo consumo de pólen ocorre pela falta de substâncias atrativas, presença de elementos tóxicos naturais ou um pobre balanço de nutrientes. Um ou mais fatores podem estar associados, entre eles a quantidade inadequada de aminoácidos essenciais e de proteína que o mesmo contenha. Schmidt *et. al.*, (1987)

alimentaram abelhas *Apis* com vinte e cinco variedades de pólen e avaliaram a longevidade média destas abelhas frente a controles que receberam apenas açúcar e água, e esses autores observaram grande variação na quantidade de pólen consumido e na longevidade das abelhas, e atribuíram essas diferenças à concentração de proteína do pólen consumido. Nossos dados corroboram com os os encontrados por Sereia (2009), que mostrou que abelhas confinadas em gaiolas alimentadas que consumiram dietas a base de levedura de cerveja e extrato de soja, apresentaram maior taxa de sobrevivência em relação as abelhas alimentadas com xarope.



**Figura 13:** Média da quantidade de abelhas sobreviventes alimentadas com diferentes dietas durante os 22 dias em gaiolas de confinamento.

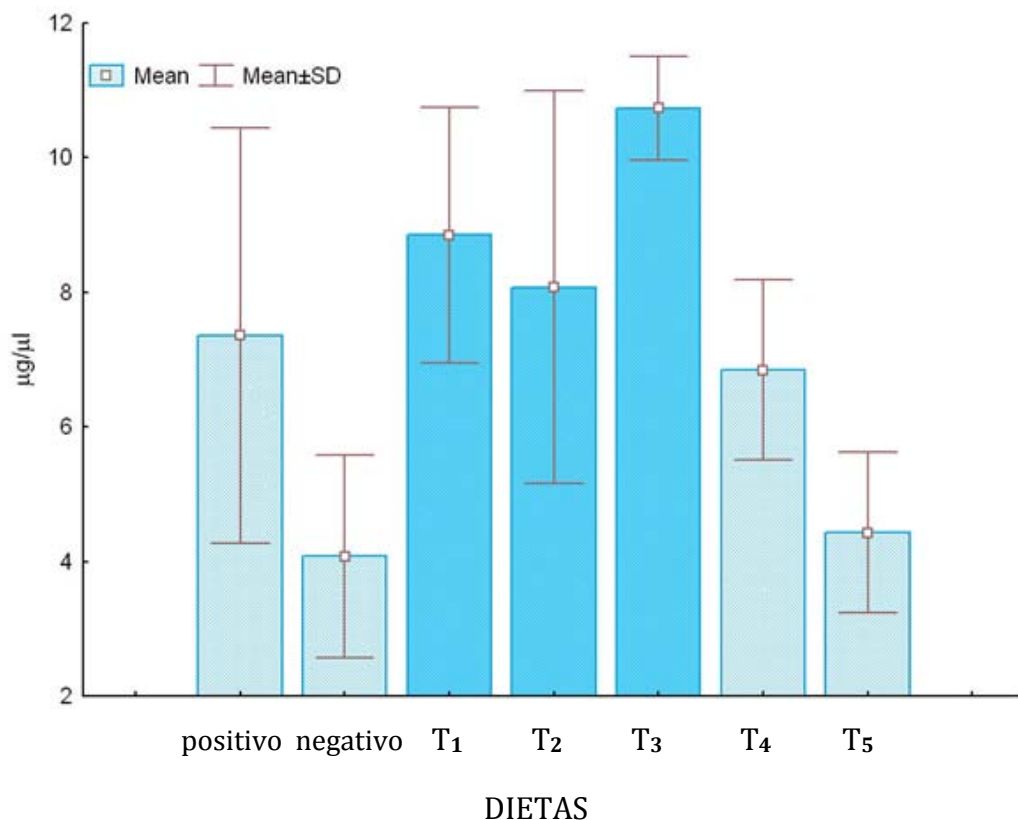
#### **4.4 - Determinação da eficiência de dietas protéicas em colônias de abelhas africanizadas no campo através do monitoramento dos pesos e mapeamento da área de cria das colônias**

##### **1º Experimento**

Após termos avaliado em laboratório as dietas (Tabela1), montamos um experimento com as colônias do campo. Nesse experimento testamos as três dietas que apresentaram os melhores resultados em relação ao nível de proteína encontrado nos testes realizados anteriormente no laboratório. Os ninhos utilizados foram instalados sobre balanças digitais. Com esse experimento pudemos avaliar se as dietas artificiais testadas anteriormente em laboratório seriam eficiente como forma de suplementação alimentar em colônias do campo, e também poderíamos verificar além da aceitação de nossas dietas, os resultados refletidos na produtividade das mesmas.

As colônias de abelhas *Apis mellifera* precisam de uma alimentação protéica para produzir cria, pois a falta desta tende a diminuir a área de cria na colônia (Herbert e Shimanuk, 1979). Dessa maneira, o método mais utilizado para determinar a eficiência das dietas suplementares é baseado na determinação da área de cria (Herbert et. al., 1970).

As dietas selecionadas para este experimento estão marcadas na (figura 14).



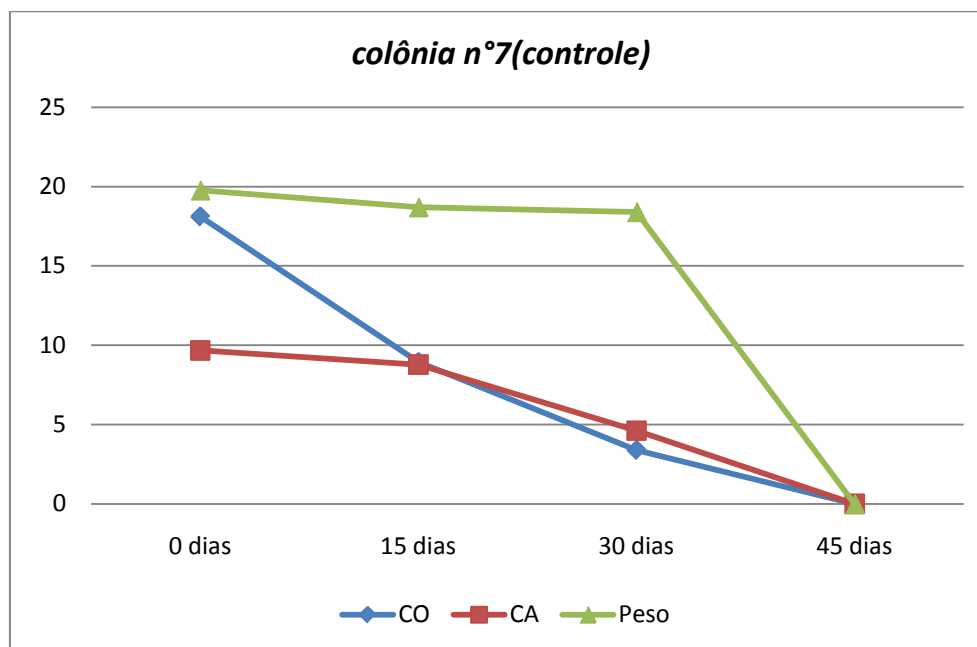
**Figura 14:** Concentração média de proteína total na hemolinfa de operárias alimentadas com as dietas selecionadas para os testes no campo.

Foram, portanto, utilizadas as dietas **T<sub>1</sub>**, **T<sub>2</sub>** e **T<sub>3</sub>** que apresentaram as porcentagens de proteína na hemolinfa das operárias respectivamente, 8,66 µg/µl, 9,89 µg/µl e 9,74 µg/µl.

Cada dieta testada foi fornecida para dois ninhos, sendo então que os ninhos utilizados foram os de número **1 e 2** (alimentados com a dieta **T<sub>1</sub>**), os ninhos **3 e 4** (alimentados com a dieta **T<sub>2</sub>**) e os ninhos **5 e 6** (alimentados com a dieta **T<sub>3</sub>**). Ressalta-se que os ninhos **7 e 8** não receberam alimentação suplementar, pois estes foram utilizados como controle. Durante todo o experimento, foi fornecido 100g de dieta suplementar artificial para cada ninho estudado, duas vezes por semana, com exceção dos ninhos estabelecidos como controle.

Dessas dietas fornecidas, as mais aceitas em relação à palatibilidade foram por ordem de aceitação, respectivamente, a **T<sub>1</sub>** (ninho **2** com consumo de 75.6% e ninho **1** com consumo de 72.4%), a dieta **T<sub>3</sub>** (ninho **6** com consumo de 41.1% e **5** com consumo de 37.9%) e a dieta **T<sub>2</sub>** (ninho **4** com consumo de 29.8% e **3** com

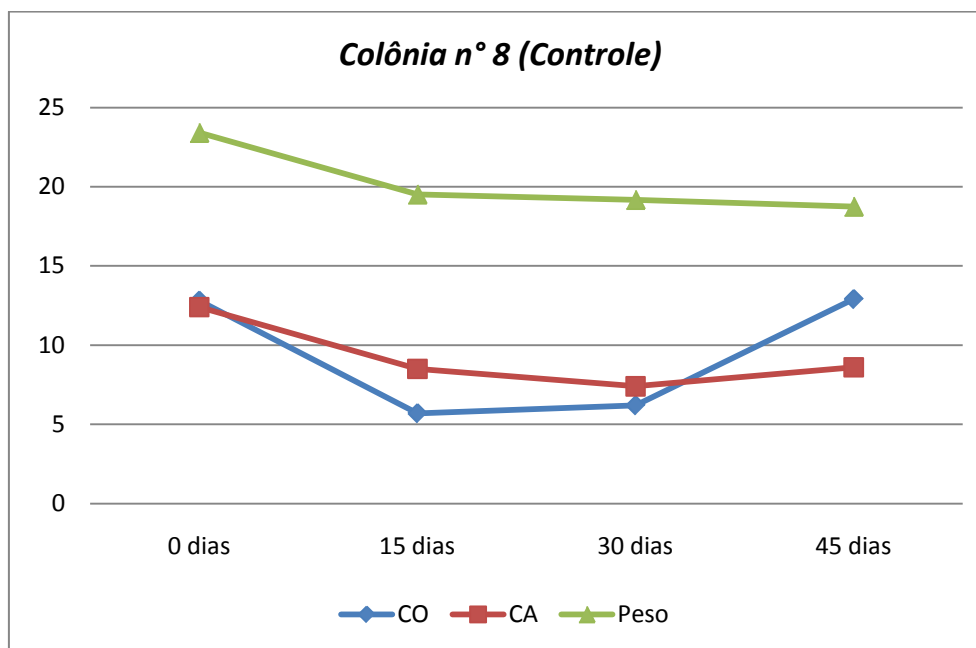
consumo de 26.2%). Os resultados referentes aos dados coletados quinzenalmente e para cada ninho estão representados nas figuras abaixo (figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22).



**Figura 15:** Colônia controle (n°7) no qual estão representados os dados coletados através de um mapeamento realizado quinzenalmente referentes à quantidade de cria operculada (CO), cria aberta (CA) e peso da colônia monitorada por balanças digitais.

Com relação aos dados mostrados na figura 15, no qual representa uma colônia controle, podemos perceber que tal ninho apresentou um grande declínio em relação aos 45 dias de estudo. No primeiro mapeamento, observamos que em relação à porcentagem de cria tanto operculada quanto aberta, que o ninho se encontrava em boas condições no início do experimento, mas à medida que o censo foi progredindo e como a colônia não recebia alimentação suplementar sob forma de proteína, já nos 15 dias de experimento houve um declínio bem acentuado na porcentagem da área de cria, principalmente na área de cria operculada o que representa a diminuição da postura pela rainha, e antes de término dos 45 dias de experimentos, a colônia enxameou completamente (abandono). Observamos que a colônia iniciou os experimentos com uma boa quantidade de cria, tanto operculada

como aberta e com um peso de aproximadamente 20 quilos. Podemos verificar que mesmo uma colônia que apresenta boas condições no início do inverno (estação mais difícil para a nossa região), se não recebe suplementação pode vir a enxamear, como foi o caso da colônia em questão.



**Figura 16:** Colônia controle (n°8) no qual estão representados os dados coletados através de um mapeamento realizado quinzenalmente referentes à quantidade de cria operculada (CO), cria aberta (CA) e peso da colônia monitorada por balanças digitais.

Diferentemente do que ocorreu com a colônia controle n° 7, a colônia n° 8, mesmo não recebendo suplementação protéica a base de proteína, sofreu um decréscimo na quantidade de crias (tanto operculada como aberta) e conseqüentemente de peso durante os 15 dias de experimento (Figura 16), mas após 30 dias de experimento a colônia conseguiu se recuperar ao ponto de os valores se igualarem aos valores obtidos no início dos experimentos (dia 0).

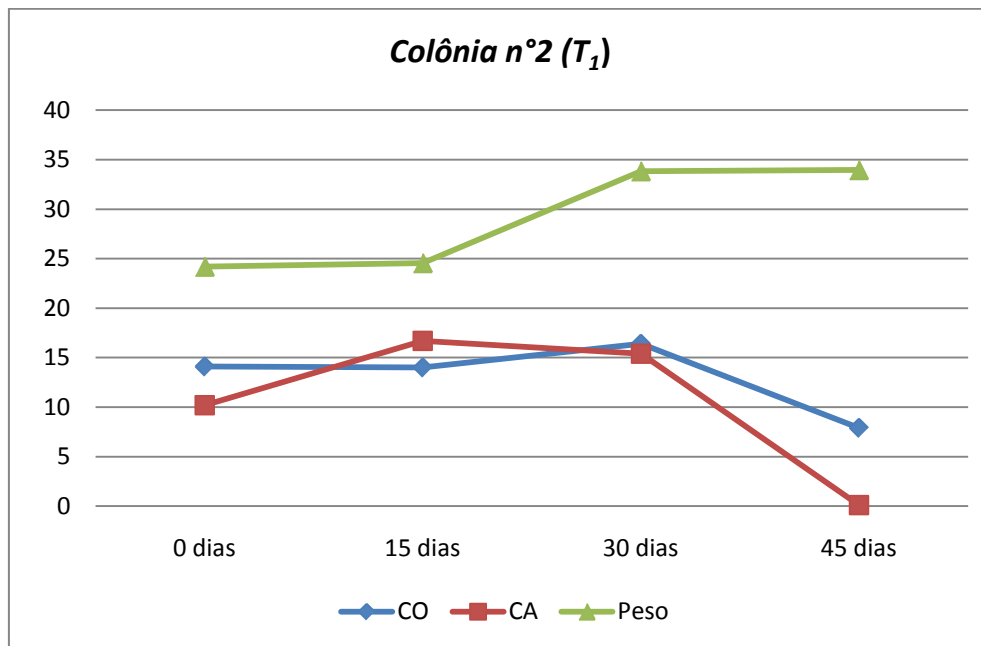
Allen e Jefree (1956) consideraram que tanto o tamanho da colônia, quanto a quantidade de pólen estocado influenciam o desenvolvimento das crias. Moeller (1958) verificou que existem vários fatores que afetam a produção de cria, tais como população da colônia, disponibilidade de alimento na natureza e área

disponível nos favos. Brandeburgo e Gonçalves (1989) mostraram que fatores climáticos também influenciam o desenvolvimento de crias.

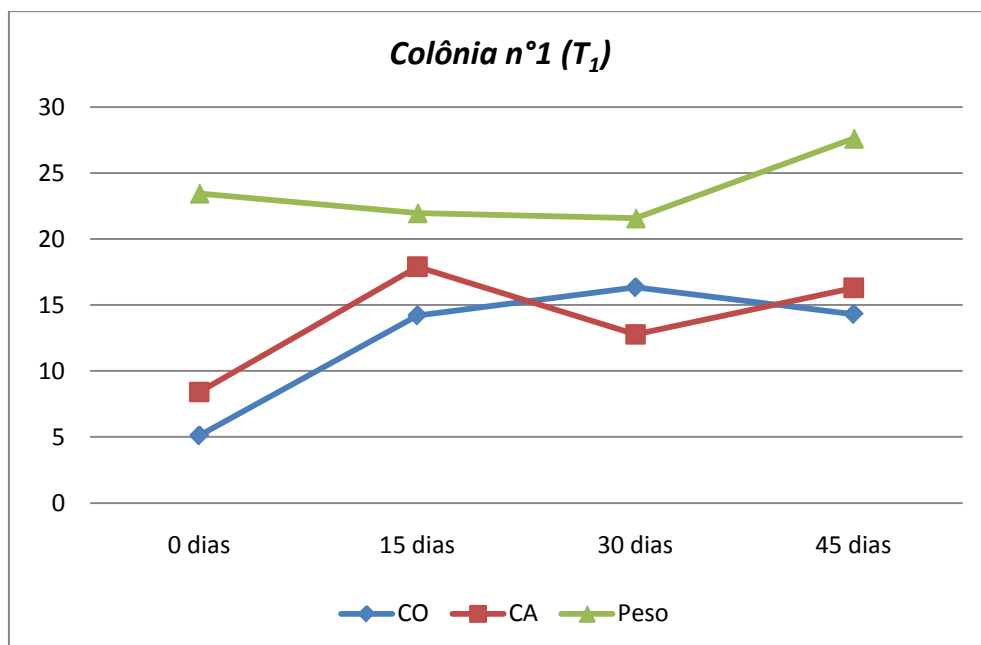
Nosso dados não são diferentes dos encontrados Cremonez, 1996, que mostram que algumas colônias mesmo não recebendo suplementação artificial pode se manter em condições até a melhora dos recursos naturais, apesar de não estarem em boas condições após o período de escassez.

Já em relação às colônias que receberam suplementação artificial, os ninhos que receberam as dietas T<sub>1</sub> apresentaram os melhores resultados em relação à quantidade de crias (operculadas e abertas) e também ao peso. Para a colônia n° 2 (figura 17), verificamos que o ninho tornou-se populoso demais dentro dos 30 primeiros dias no qual o experimento foi iniciado e 35 dias após iniciarmos os testes, a colônia sofreu uma enxameação do tipo reprodutiva, na qual a rainha sai com uma quantidade de operárias e na colônia ficam as operárias restantes com a rainha virgem (Almeida, 2008). Pode-se notar que houve um aumento de peso no 30<sup>o</sup> dia do experimento, pois foi introduzido um sobre ninho para tentar conter a enxameação, mas mesmo com esse aumento, as operárias que já apresentam memória enxameatória (pois vinham tentando realizar esta atividade há dias), conseguiram realizar o feito. Verificamos que mesmo com essa enxameação, a colônia manteve-se populosa o suficiente para dar continuidade às atividades das operárias que lá ficaram. Como a rainha que ficou na colônia era virgem, precisou de um tempo para realizar a cópula e depois começar a botar para assim, aumentar os níveis de cria no ninho.





**Figura 17:** Colônia n°2 (alimentado com a dieta  $T_1$ ) no qual estão representados os dados coletados através de um mapeamento realizado quinzenalmente referentes à quantidade de cria operculada (CO), cria aberta (CA) e peso da colônia monitorada por balanças digitais.

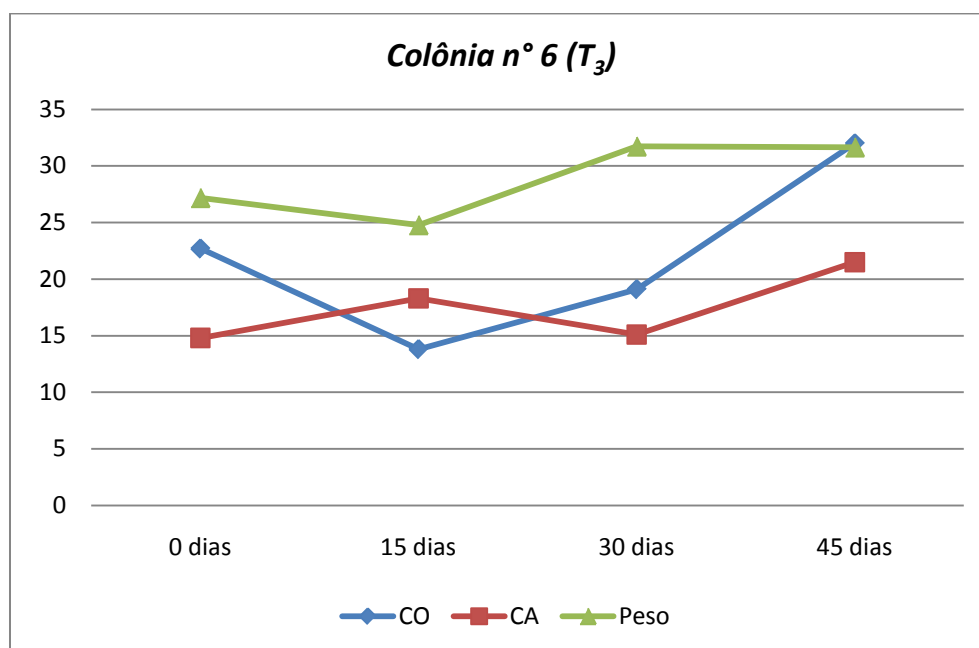


**Figura 18:** Colônia n°1 (alimentado com a dieta  $T_1$ ) no qual estão representados os dados coletados através de um mapeamento realizado quinzenalmente referentes à quantidade de cria operculada (CO), cria aberta (CA) e peso da colônia monitorada por balanças digitais.

Para a colônia n°1 alimentada com a dieta T<sub>1</sub>, (figura 18) pudemos verificar que da mesma maneira que ocorreu com a colônia n°2, após 15 dias do início dos experimentos, sofreu uma enxameação do tipo reprodutiva. Sendo assim, verificamos que no censo de 30 dias, houve uma queda na quantidade de crias operculadas e também no peso da colônia, mas mesmo sofrendo a enxameação, o referido ninho retomou suas atividades normais.

Segundo Doull (1980) a alimentação suplementar mostra correlação positiva com o aumento da área de cria e produtividade da colônia.

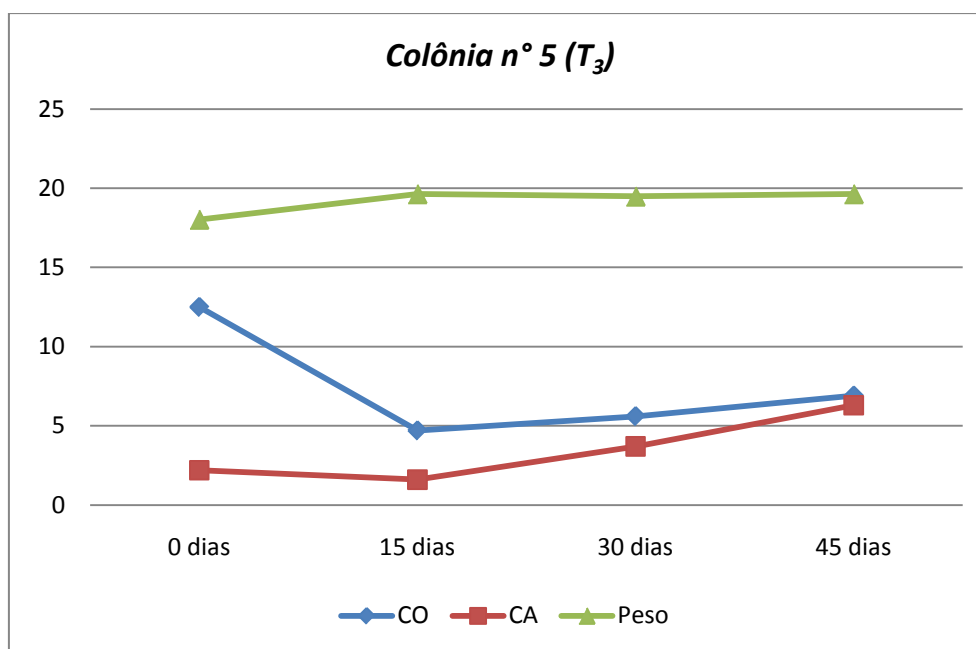
As colônias que receberam a dieta T<sub>1</sub>, foram as que mais consumiram o alimento fornecido (75,6% e 72,4%) e nossos dados corroboram com os encontrados por Cremonez 1996, que mostra que colônias alimentadas com uma dieta a base farelo de soja e levedura de cana tiveram aumento na área de cria.



**Figura 19:** Colônia n°6 (alimentado com a dieta T<sub>3</sub>) no qual estão representados os dados coletados através de um mapeamento realizado quinzenalmente referentes à quantidade de cria operculada (CO), cria aberta (CA) e peso da colônia monitorada por balanças digitais.

O ninho 6, alimentado com a dieta T<sub>3</sub> (figura 19), apresentou aos 15 dias de experimento um declínio no peso e principalmente na quantidade de cria operculada, mas depois dos 30 dias de alimentação suplementar observamos um aumento expressivo (tanto para a quantidade das crias, quanto para o peso da colônia) dentro dos 45 dias no qual foi alimentado com o suplemento artificial protéico. Após o término dos experimentos, o referido ninho ganhou um aumento de um sobreninho devido ao aumento da quantidade da população de abelhas e quantidade de crias.

Segundo Mattila e Otis, de 2006; Nabors, 2000 e Standifer et al, 1973, as dietas como substitutos de pólen podem ser eficazes para manter as colônias nos períodos de escassez, e podem ser capazes de manter a postura da rainha, mas para isso devem ser nutritivas e palatáveis para as abelhas. Sendo assim, pudemos observar que a dieta T<sub>3</sub> além de apresentar o melhor desempenho em relação ao nível de proteína na hemolinfa de abelhas confinadas em gaiolas, foi também a segunda dieta mais consumida pelas abelhas.



**Figura 20:** Colônia n°5 (alimentado com a dieta T<sub>3</sub>) no qual estão representados os dados coletados através de um mapeamento realizado quinzenalmente referentes à quantidade de cria operculada (CO), cria aberta (CA) e peso da colônia monitorada por balanças digitais.

Já para a colônia nº5 (figura 20), também alimentada com a dieta T<sub>3</sub>, apresentou um comportamento diferente do visualizado pelo colônia nº6.

A porcentagem de cria operculada dentro dos 45 dias de experimento, no qual as operárias receberam suplementação artificial a base de proteína, sofreu um decréscimo na quantidade de cria operculada durante os 15 primeiros dias de mapeamento, diferentemente do que ocorreu com a quantidade de cria aberta, no qual, ao longo do experimento foi apresentando um aumento progressivo. Assim, podemos perceber que o peso do ninho não sofreu alteração durante o período experimental, mas observamos que a colônia se manteve bem depois do fim do experimento.

O consumo das colônias que receberam a dieta T<sub>3</sub> (41,1% e 37,9%), como forma de suplementação foi menor que o consumo da dieta T<sub>3</sub>, mesmo assim as colônias alimentadas com a dieta T<sub>3</sub>, mostraram um aumento significativo nas áreas de cria mostrando ser assim um bom suplemento protéico para as colônias

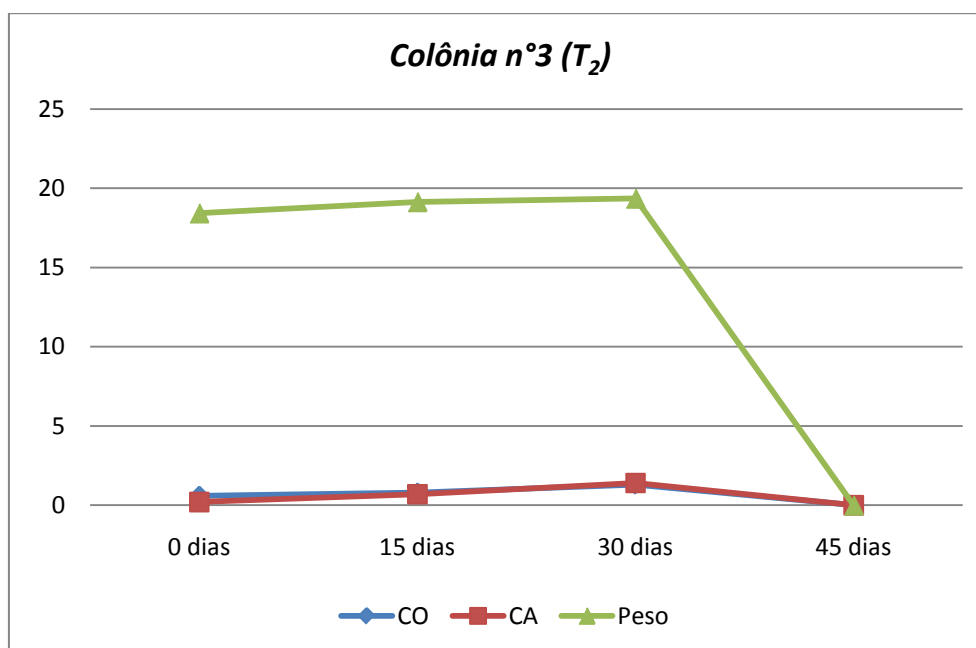
Concluimos então que o fornecimento de dietas suplementares é muito importante para a manutenção e aumento de colônias durante os períodos de pouco alimento na natureza, já que os ninhos alimentados com as dietas T<sub>1</sub> E T<sub>3</sub> apresentaram aumento na área de cria em relação aos ninhos controles, que não receberam nenhum tipo de alimentação.

Nossos dados diferem dos encontrados por Cremonez, 1996, onde o maior aumento na área de cria e no peso foi encontrado nas colônias alimentadas com pólen e açúcar.

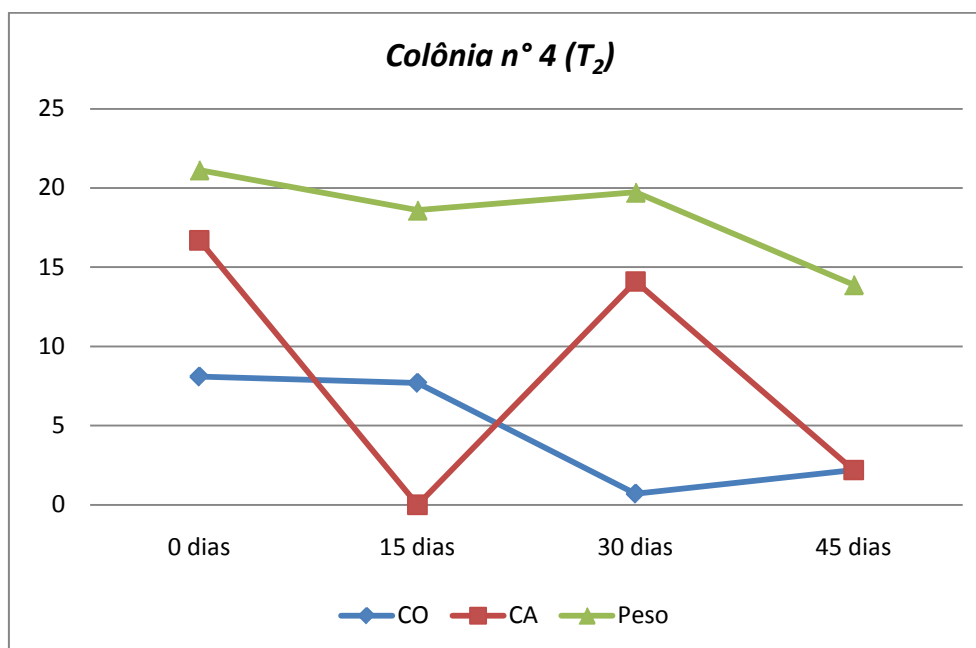
Hagedorn e Moeller (1968) verificaram que pequenas colônias alimentadas com suplementos artificiais produziram mais crias. Portanto nossos dados estão de acordo com os encontrados por Nation e Robinson (1971), que as colônias alimentadas com suplementos protéicos produzem mais crias que as que não recebem.

Para a dieta T<sub>2</sub> (dieta que apresentou o menor desempenho perante as outras), verificamos através dos dados obtidos na colônia n° 3 (figura 21), que a dieta não foi capaz de fornecer uma recuperação à colônia. No início dos experimentos, colônia n° 3 já apresentava-se em condições fracas, perante os outros ninhos envolvidos no estudo. Mesmo assim, tal colônia foi alimentada com o suplemento artificial, mas acabou que sofreu um enxame por abandono. Desta enxameação não restou nenhum indivíduo dentro da colônia.

Podemos observar também que a dieta fornecida a essa colônia foi pouco consumido (26,2%), mesmo as operárias não tendo grandes disponibilidades de fontes de recursos para serem coletados naquela época. E mesmo apresentando um bom desempenho nos testes em laboratório essa dieta não apresentou uma boa aceitação das operárias das colônias no campo, segundo Herbert e Shimanuki (1978), os substitutos de pólen executam eficientemente todas as funções do pólen, mas a principal dificuldade é a aceitação das abelhas.



**Figura 21:** Colônia n°3 (alimentado com a dieta T<sub>2</sub>) no qual estão representados os dados coletados através de um mapeamento realizado quinzenalmente referentes à quantidade de cria operculada (CO), cria aberta (CA) e peso da colônia monitorada por balanças digitais.



**Figura 22:** Colônia nº4 (alimentado com a dieta T<sub>2</sub>) no qual estão representados os dados coletados através de um mapeamento realizado quinzenalmente referentes à quantidade de cria operculada (CO), cria aberta (CA) e peso da colônia monitorada por balanças digitais.

Para a colônia nº4, alimentado com a dieta T<sub>2</sub> podemos notar que ao longo do experimento (45 dias) sofreu uma queda na quantidade de cria operculada, e para cria aberta, mesmo com as oscilações apresentadas durante o experimento, a colônia manteve-se fraca. Devido a isso, o ninho foi transferido para um núcleo na expectativa de mantermos a população sem que sofrêssemos perda por abandono. Essa colônia consumiu apenas 29,8% do alimento oferecido, mostrando que as colônias alimentadas com a dieta T<sub>2</sub> apresentaram o menor consumo do alimento e também o menor desempenho em relação ao aumento e manutenção da área de cria. A dieta T<sub>2</sub> nos testes em laboratório apresentou um bom desempenho, porém no campo o consumo foi baixo e essa dieta mesmo tendo como base em seu preparo a quinua (ingrediente com alto valor protéico) não foi capaz de manter as colônias do campo, um fator responsável pode ter sido a falta de palatibilidade dessa dieta, que não foi atrativa para as abelhas.

Estes resultados sugerem que as diferenças na qualidade nutricional da dieta (ou seja, quantidade de proteínas e carboidratos) e talvez a digestibilidade e acessibilidade dos seus nutrientes para as abelhas podem influenciar a quantidade de crias, mesmo quando as taxas de consumo são semelhantes. Além dos fatores

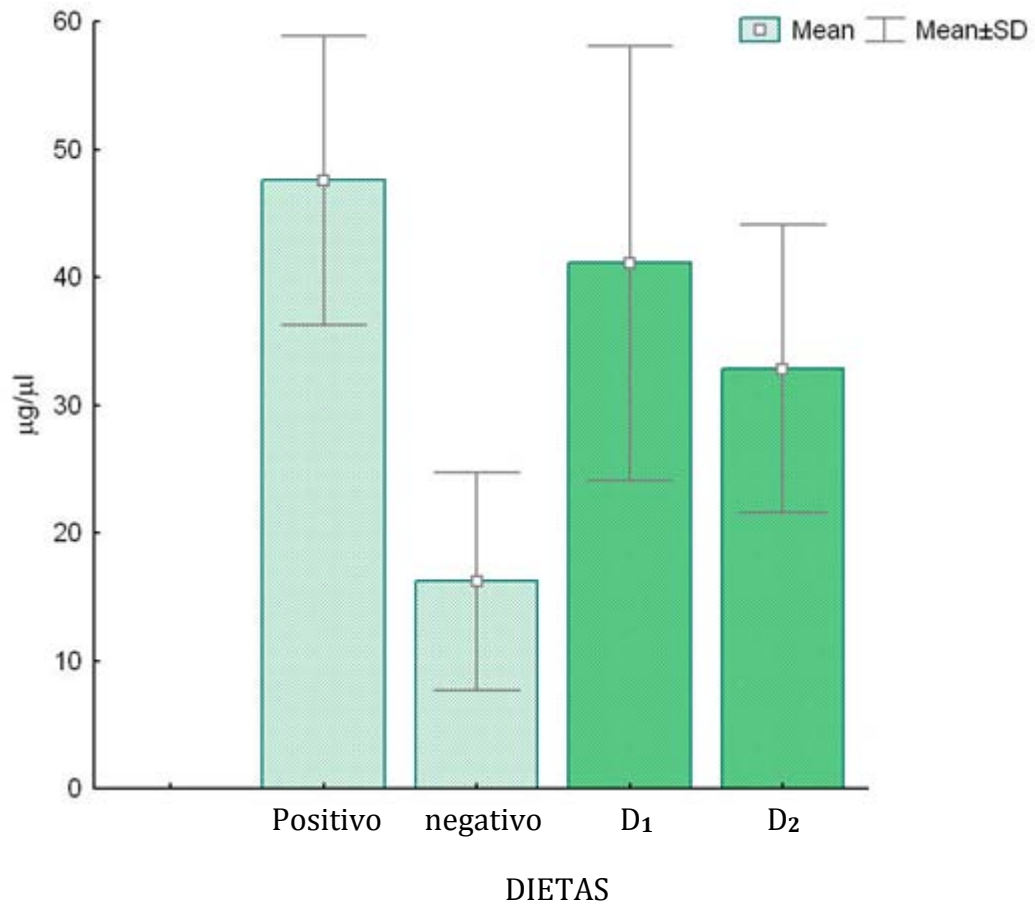
nutricionais, produções de cria e do crescimento populacional em colônias são afetadas pela qualidade da rainha e do tamanho da população de operárias adultos (Winston, 1987; Degrandi-Hoffman *et. al.*, 1989).

### **Teste no campo**

#### **2º Experimento**

Nesse segundo experimento no campo, avaliamos as dietas descritas na tabela 2, que haviam sido testadas anteriormente no laboratório. Esse experimento foi montado utilizando núcleos instalados sobre balanças digitais. Assim, pudemos avaliar também a eficiência dessas dietas nas colônias do campo, bem como a aceitação e consumo pelas operárias. Esses experimentos nos permitiram verificar os resultados refletidos na produtividade da colônia e reserva de recursos alimentares.

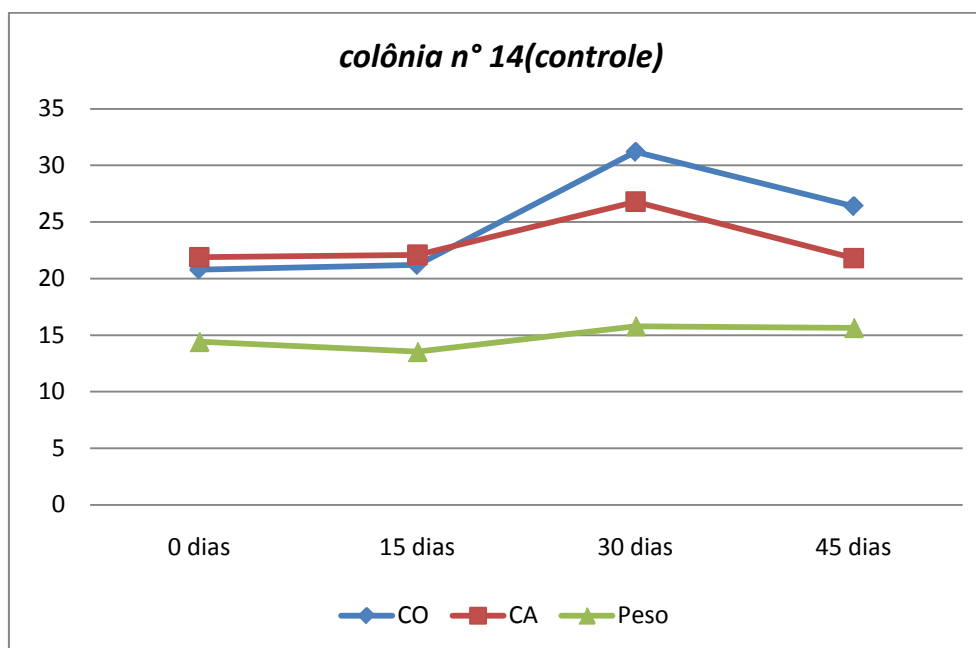
Nesse experimento, foram selecionadas duas dietas (figura 23) que haviam sido elaboradas e testadas em laboratório com abelhas mantidas nas gaiolas de confinamento e que apresentaram um bom desempenho em relação ao nível de proteína na hemolinfa das abelhas alimentadas com essas dietas.



**Figura 23:** Concentração média de proteína total na hemolinfa de operárias alimentadas com as dietas selecionadas para os testes no campo.

Os núcleos utilizados foram os de número **9 e 10** (alimentados com a dieta **D<sub>1</sub>**), os núcleos **11 e 12** (alimentados com a dieta **D<sub>2</sub>**) os ninhos **13 e 14** não receberam alimentação suplementar, pois estes foram utilizados como controle. O consumo das respectivas dietas foi: em relação ordem de aceitação, os núcleos 11 e 12 que receberam a dieta T<sub>5</sub>, o consumo foi respectivamente de 59,94% e 45,05%, enquanto nos núcleos 9 e 10 alimentados com a dieta T<sub>4</sub> o consumo foi respectivamente de 46,15% e 24,57%. Os resultados referentes aos dados coletados quinzenalmente e para cada ninho estão representados nas figuras abaixo (figuras 24, 25, 26, 27, 28, 29).





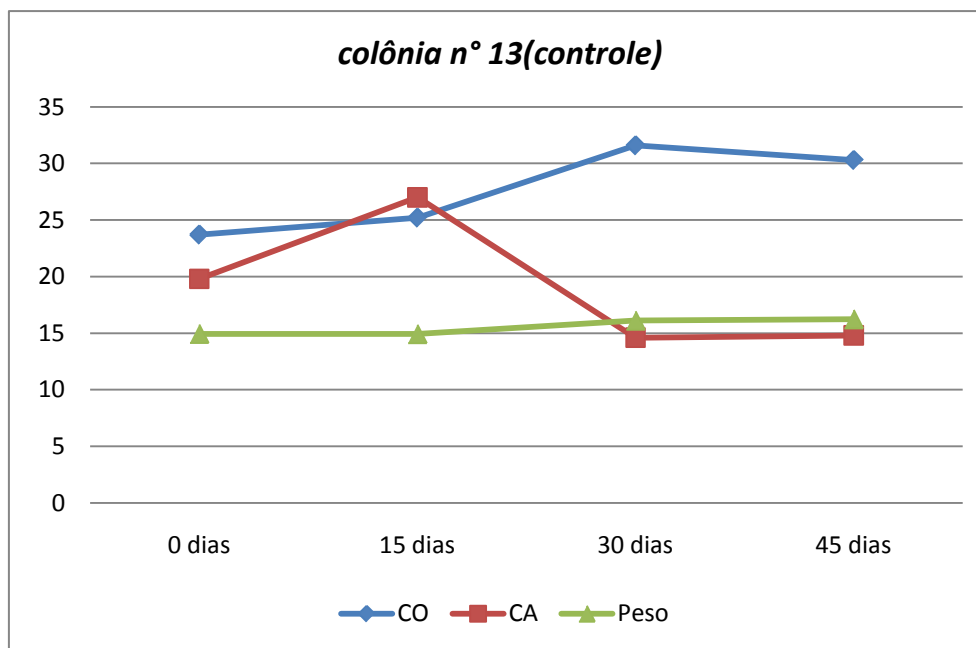
**Figura 24:** Colônia controle (n°14) no qual estão representados os dados coletados através de um mapeamento realizado quinzenalmente referentes à quantidade de cria operculada (CO), cria aberta (CA) e peso da colônia monitorada por balanças digitais.

Com relação aos dados mostrados na figura 24, no qual representa uma colônia controle, pudemos perceber que tal colônia apresentou um aumento em todos os aspectos em relação aos 30 dias de estudo. Tanto no primeiro quanto no segundo mapeamento, pudemos observar através da porcentagem de cria operculada, quanto aberta, que a colônia se encontrava em boas condições. Porém ao passar dos dias, como a colônia não recebia alimentação suplementar sob forma de proteína, antes de término dos 45 dias de experimentos, a colônia mostrou um declínio nas áreas de cria, mas sem que causasse qualquer tipo de prejuízo para a colônia. Como esta encontrava-se em boas condições desde o início do experimento, mesmo com a queda dos recursos devido ao período do estudo (inverno), não sofreu danos.

Na prática, os apicultores percebem que as abelhas têm baixas reservas de pólen, e uma quantidade inadequada de proteínas, observando a quantidade da área de cria. Durante a temporada de boas reservas de pólen, a produção de crias de zangão é ativa, e quando as reservas de pólen são baixas, podemos notar a falta das larvas de zangão. Posteriormente, as abelhas removem e consomem as larvas de operárias desoperculadas, deixando apenas as crias operculadas (Morse, 1975).

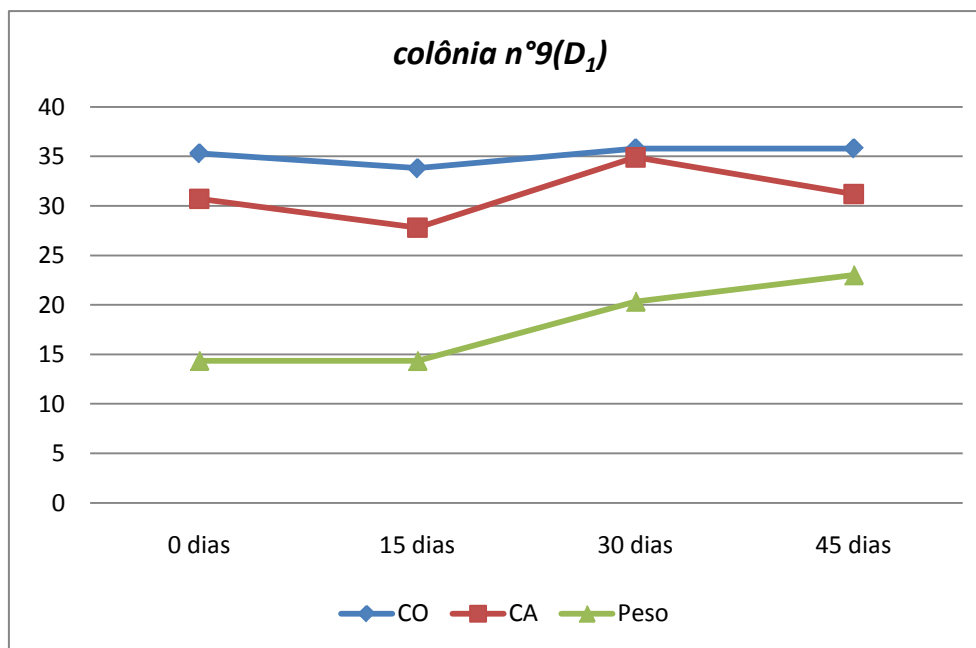
Assim, podemos observar que, durante algum tempo sem alimentação suplementar, dependendo apenas dos recursos naturais disponíveis, essas colônias conseguem se manter, com suas reservas, mas após um período sem muita disponibilidade desses recursos, a rainha diminui sua postura.

Nossos dados estão semelhantes ao encontrados por Steen (2007), que mostrou que ocorreu uma diminuição na quantidade de larvas nas colônias sem alimentação suplementar nos períodos de escassez de pólen na natureza. Diferentemente do que aconteceu com a colônia controle 13, que mesmo não recebendo suplementação protéica a base de proteína, sofreu um decréscimo na quantidade de cria aberta, e nos 30 dias de experimento mostrou uma melhora também na porcentagem de cria operculada. O peso se manteve sem grandes oscilações durante todo o experimento, mas após os 30 dias de experimento pudemos notar um declínio muito grande da quantidade de área de cria aberta e um aumento na área de cria operculada. Provavelmente, devido ao fato das operárias não encontrarem uma grande quantidade de recursos alimentares no campo neste período, a rainha por não receber a quantidade ideal de alimentação protéica, reduziu a taxa de postura e conseqüentemente, a quantidade de cria aberta diminuiu também. Em relação ao aumento da quantidade de cria operculada, essa aumentou, pois à medida que o tempo ia passando as crias abertas, necessitavam ser operculadas para passarem pelo processo de metamorfose. Herbert *et. al.*, (1977) encontraram que, quando colônias eram alimentadas com dietas com baixas concentrações de proteína, as rainhas continuavam a fazer a postura e mantinham as crias por um pequeno período de tempo. Nossos dados encontrados nas colônias controle, dependiam apenas das poucas reservas de alimento presentes na natureza no período de realização desse trabalho. Esses dados assemelham-se com os encontrados por Herbert *et. al.* (1977), pois pudemos observar que o declínio na porcentagem da área de cria desoperculada indica a falta de postura da rainha.



**Figura 25:** Colônia controle (n°13) no qual estão representados os dados coletados através de um mapeamento realizado quinzenalmente referentes à quantidade de cria operculada (CO), cria aberta (CA) e peso da colônia monitorada por balanças digitais.

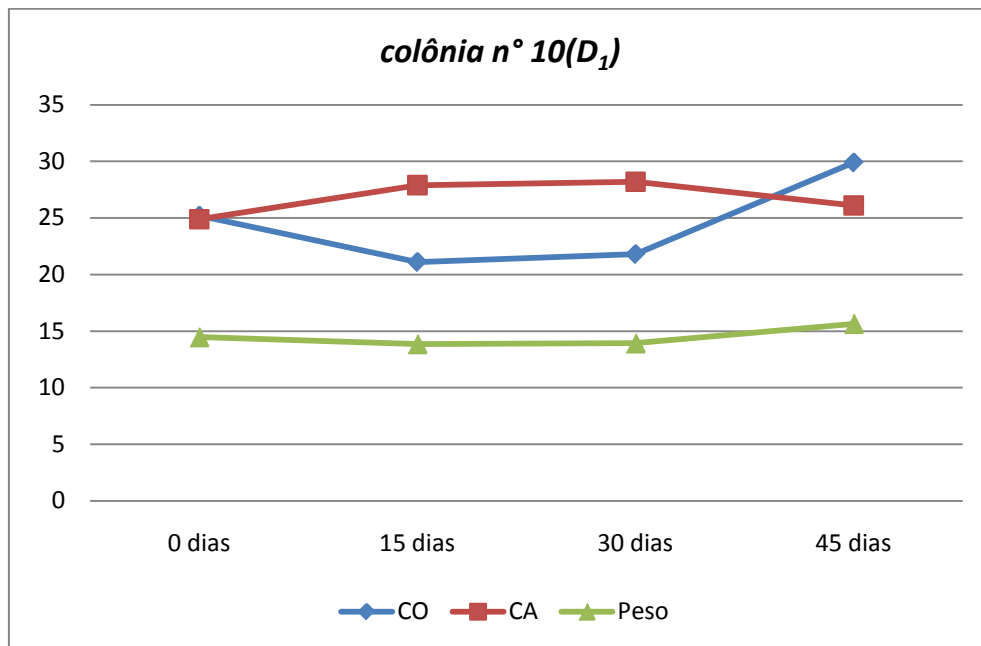
As abelhas compensam a deficiência de pólen diminuindo a quantidade de crias através da redução na postura da rainha, ou por canibalismo de larvas jovens (Schmickl & Crailsheim 2001). Eventualmente, ocorre o declínio da população dessa colônia, porque, sem produção de novas crias de operárias, não há renovação das operárias adultas. Dessa maneira, os apicultores muitas vezes, sentem a necessidade de estimular suas colônias a crescer, e isso pode ser feito através da alimentação estimulante que começa até seis semanas antes de uma florada de néctar, fazendo com que as colônias estejam mais fortes para o momento da produção de mel. Normalmente, os apicultores utilizam xarope de açúcar, no entanto, isso não é suficiente para manter as colônias quando as fontes de pólen são insuficientes (Morse 1975, Herbert, 1992).



**Figura 26:** Colônia nº 9(alimentada com a dieta D<sub>1</sub>) no qual estão representados os dados coletados através de um mapeamento realizado quinzenalmente referentes à quantidade de cria operculada (CO), cria aberta (CA) e peso da colônia monitorada por balanças digitais.

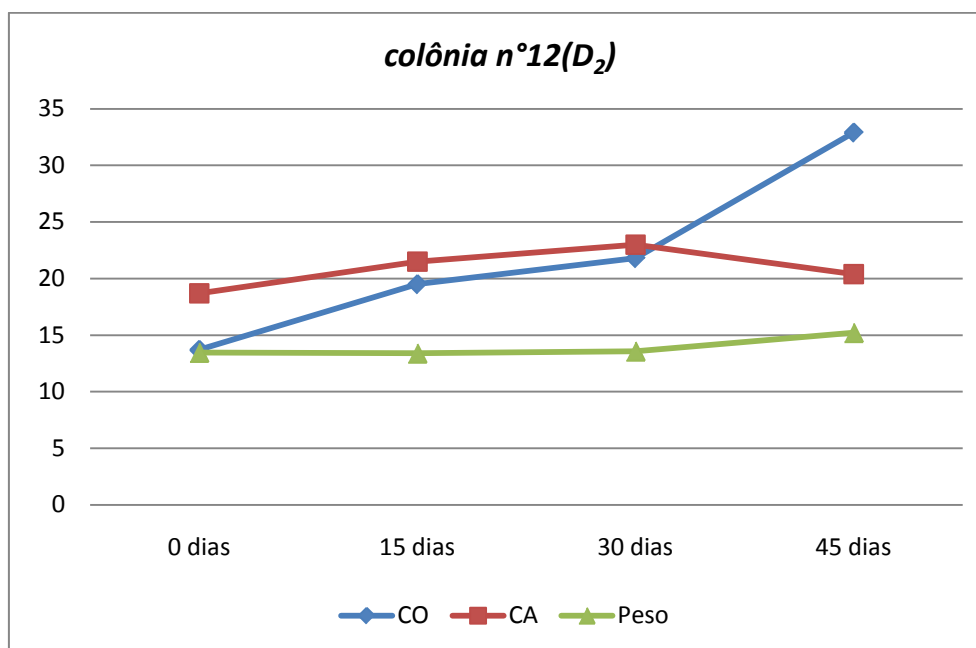
A colônia nº9 (alimentada com a dieta D<sub>1</sub>) apresentou um aumento nos 30 dias de experimento (tanto para a quantidade das crias, quanto para o peso da colônia), e durante os 45 dias no qual foi alimentado com o suplemento artificial protéico precisou ser transformado de núcleo (caixa com 5 quadros) para ninho (caixa com 10 quadros) pois houve um grande aumento populacional dessa colônia. Esse fato fez com que as operárias realizassem três tentativas de enxameação (enxameação reprodutiva), antes do sobrenúcleo ser introduzido. Este fato permitiu que as operárias não tivessem mais necessidade de enxamear por falta de espaço.

A área de cria aumentou durante o experimento, mostrando que o alimento protéico promove o aumento da postura pela rainha (Herbert e Shimanuk, 1979)



**Figura 27:** Colônia nº10(alimentada com a dieta  $D_1$ ) no qual estão representados os dados coletados através de um mapeamento realizado quinzenalmente referentes à quantidade de cria operculada (CO), cria aberta (CA) e peso da colônia monitorada por balanças digitais.

Na colônia nº10 também alimentada com a dieta  $D_1$ , pudemos observar que a quantidade de cria aberta praticamente se manteve durante todo o experimento, tendo apenas um leve declínio aos 45 dias de experimento, mas a área de cria operculada apresentou um crescimento significativo ao final do experimento.

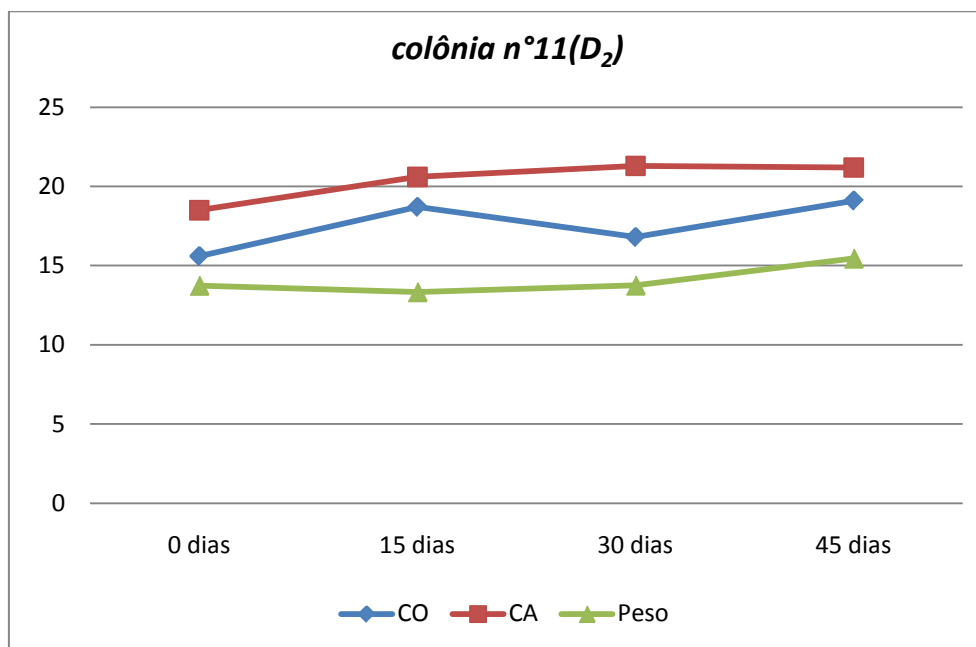


**Figura 28:** Colônia nº12(alimentada com a dieta **D<sub>2</sub>**) no qual estão representados os dados coletados através de um mapeamento realizado quinzenalmente referentes à quantidade de cria operculada (CO), cria aberta (CA) e peso da colônia monitorada por balanças digitais.

Essa colônia (nº12) alimentada com a dieta **D<sub>2</sub>** mostrou ao longo dos 45 dias de experimento um aumento na porcentagem da área de cria operculada quanto aberta, sendo que com 45 dias de alimentação suplementar artificial protéica pudemos observar um aumento expressivo na porcentagem da área de cria operculada e um leve aumento no peso. Ao final do experimento, essa colônia passou para ninho, pois teve um aumento populacional, e assim a necessidade do aumento da caixa.

Durante os períodos de escassez, as colônias de abelhas precisam do pólen ou dietas protéicas suplementares, além de açúcar. Na prática, o uso de um bom suplemento protéico depende da disponibilidade dos ingredientes para cada região do país além do preço desses ingredientes. O pólen coletado pelos apicultores é usado algumas vezes, mas é caro e pode ser um meio de transmissão de patógenos causadores de doenças (De Jong, 1977). As dietas protéicas artificiais são importantes para esses apicultores interessados em preparar as abelhas para produção de mel, bem como os apicultores e agricultores que necessitam de suas colônias fortes para a polinização e um substituto do pólen

deve ser de baixo custo, nutricionalmente adequada e prontamente consumido pelas abelhas (Herbert 1992).



**Figura 29:** Colônia n°11(alimentada com a dieta D<sub>2</sub>) no qual estão representados os dados coletados através de um mapeamento realizado quinzenalmente referentes à quantidade de cria operculada (CO), cria aberta (CA) e peso da colônia monitorada por balanças digitais.

A colônia n°11, que foi alimentada com a dieta D<sub>2</sub> demonstrou ao longo de todo o experimento um aumento progressivo tanto nas áreas de crias aberta e operculada quanto no peso e se manteve forte e crescendo até o fim do experimento.

Nas duas colônias alimentadas com a dieta D<sub>2</sub>, pudemos observar que essa dieta foi capaz de suprir a necessidade das colônias durante e depois do período do experimento, com aumento do peso das colônias relacionado com o aumento da área de cria dessas colônias. A dieta D<sub>2</sub> é uma dieta preparada com ingredientes de fácil acesso aos apicultores e pode ser utilizadas como dieta suplementar.

Kerr e Fava (1970) verificaram que os meses de junho, novembro e fevereiro os pesos das colônias diminuem, devido à diminuição da área de cria e reservas de alimento. E nossos dados correspondem aos encontrados por Nation e

Robinson (1971) e Standifer et. Al. 1971, onde colônias que receberam dietas protéicas suplementares produziram mais crias que as que não receberam nada.

As abelhas *A. mellifera* necessitam de proteínas para produzirem cria (Herbert e Shimanuki, 1979). Os carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais, são fatores responsáveis pela quantidade de cria produzida, longevidade e produtividade da colônia, e colônias que tem consumos limitados desses nutrientes podem ter a produção de crias cessada e a sobrevivência da colônia comprometida (Brodshneider e Crailsheim, 2010).

O fornecimento de dietas suplementares para colônias durante os períodos de escassez alimentar na natureza é muito importante, sendo que uma colônia com limitação de nutrientes essenciais tais como o pólen, em geral, um aminoácido essencial, ou vitamina em particular, apresentará um declínio na produção de cria e não poderá sobreviver se não for fornecido alimento nesse período.

Recentemente, muitos apicultores tem relatado muitas perdas de colônias, e isso colocou a nutrição das abelhas no foco das pesquisas, já que colônias mal nutridas podem ser um dos fatores determinantes por tais perdas (Oldroyd, 2007; Naug, 2009).

vanEngelsdorp, *et al.*, 2009 mostraram que as operárias de colônias afetadas pelo CCD não apresentaram alterações no estado nutricional de proteínas. Ainda assim, a nutrição das abelhas tem muitas ameaças potenciais (Brodshneider e Crailsheim, 2010), a diversidade das dietas reduzidas devido às monoculturas, agrotóxicos que são trazidos para a colônia com o alimento. Por isso, futuras pesquisas devem levar em conta a interação de possíveis efeitos relacionados com a nutrição com outros fatores, tais como a influência da nutrição sobre a suscetibilidade ou tolerância das abelhas aos parasitas, patógenos e agrotóxicos. Mayack e Naug (2009), estudaram o papel da nutrição no sistema imunológico das abelhas. Os estudos de Szymas e Jedruszuk (2003) relataram a importância da nutrição das abelhas em relação à capacidade em se defender de patógenos é como essa capacidade pode ser melhorada através de uma nutrição adequada. Quando uma colônia de abelhas é considerada como um super-organismo (composto por três níveis de nutrição), a desnutrição pode ocorrer em qualquer nível, e isso revela um aspecto importante sobre o estresse nutricional: larvas criadas durante a falta de um nutriente essencial pode gerar adultos de vida



curta ou adultos prejudicados em habilidades como a de forrageamento (Brodschneider et al, 2009 ).

Para manter uma colônia saudável é recomendada uma nutrição equilibrada, especialmente quando eles são colocados em ambiente de pouca disponibilidade de alimento ou utilizados para a polinização (Schmidt et al, 1984. Pernal e Currie, 2000;). A alimentação equilibrada é melhor quando existe uma crescente diversidade de plantas, mesmo perto de áreas agrícolas, uma mistura natural de polens diferentes é a fonte ideal de proteínas e vitaminas para as abelhas (Decourtye et al., 2010). Se isso não for possível, a alimentação suplementar é recomendada, mesmo que a dieta suplementar apresente qualidade inferior ao pólen natural, porque essas dietas apesar dessa inferioridade em relação ao pólen podem fornecer muitos nutrientes essenciais a essas colônias, e muitos estudos têm mostrado a eficiência dessas dietas suplementares em abelhas alimentadas exclusivamente com essas dietas. (Steen 2007)

Sendo assim é importante a utilização de dietas proteicas suplementares para alimentar colônias em períodos de pouca disponibilidade de recursos naturais pois, as colônias alimentadas com essas dietas podem se manter saudáveis, com produção de crias até os períodos de abundância de alimentos naturais.

## 5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira geral, a proposta apresentada para a presente dissertação foi alcançar os seguintes objetivos:

- Através de testes de laboratório avaliar a eficiência de diferentes tipos de dietas artificiais, desenvolvidas com diferentes ingredientes protéicos para serem utilizadas como suplementos proteicos, a fim de suprir as necessidades protéicas das abelhas *A. mellifera*.
- Dosar a quantidade de proteínas na hemolinfa de abelhas operárias recém nascidas mantidas em estufas e alimentadas com as diferentes dietas durante sete dias.
- Testar as dietas que apresentaram um bom desempenho nos testes em laboratório nas colônias do campo nas épocas de escassez, no Apiário experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP).
- Avaliar o desempenho das dietas como suplemento alimentar por meio de métodos como: análise da área de cria através de mapeamentos realizados quinzenalmente, pesagem diária das colônias.

Destas perguntas analisadas através de experimentos, alguns pontos merecem destaque, como sendo inovadores ou confirmando outras hipóteses já levantadas em outros trabalhos.

- A análise da concentração de proteína na hemolinfa de abelhas operárias durante 30 dias de vida adulta mostrou que as abelhas que foram coletadas no inverno, independente da idade, apresentaram uma concentração de proteína mais baixa em relação às operárias que foram coletadas no verão, esse trabalho mostrou que podemos afirmar a necessidade de uma alimentação suplementar artificial em períodos de escassez alimentar como nosso caso, o período de inverno.
- Observamos que a dieta (T<sub>1</sub> à base de farelo de soja, farelo de arroz, levedura de cana-de-açúcar, açúcar e água; T<sub>2</sub> à base de quinua, açúcar e mel; T<sub>3</sub> à base de

farelo de soja, farinha de milho, açúcar e mel; T<sub>4</sub> à base de farelo de soja, lentilha, açúcar e água; e T<sub>5</sub> à base de farelo de soja, farelo de arroz, levedura de cana-de-açúcar e mel) mostraram um bom resultado quando comparadas ao controle positivo, sendo que as dietas T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> apresentaram níveis superiores aos encontrados nas abelhas alimentadas com bee bread, nos testes no laboratório mostrando assim que temos três boas dietas que podem ser utilizadas como suplementação alimentar.

- A redução da oferta de alimento na natureza, em diferentes estações, é refletida na diminuição do título de proteína na hemolinfa de operárias adultas de abelhas *Apis mellifera*. O alimento armazenado nessa época de escassez pelas colônias não é suficiente para permitir que as abelhas alcancem os títulos normais de proteína observados nas operárias que se desenvolvem em condições de fartura de alimento.
- A dieta D<sub>1</sub> (à base de albumina, extrato de soja, açúcar e água) e a dieta D<sub>2</sub> (à base de levedo de cerveja, leite de soja, farelo de arroz e açúcar e água), mostraram um bom desempenho nutricional em relação ao nível de proteína na hemolinfa quando comparadas ao controle positivo.
- A dieta D<sub>3</sub> base de fubá, não permitiu a síntese de proteína total em níveis normais. Mostrando não ser um a boa dieta para ser utilizada em períodos de escassez alimentar.
- Os testes laboratoriais de quantificação de proteína total em abelhas confinadas mostraram ser eficientes para avaliar as dietas protéicas.
- Concluímos que tanto as abelhas alimentadas com a dieta D<sub>2</sub> ou com bee bread (controle positivo) sobrevivem mais tempo do que as abelhas alimentadas apenas com xarope nas gaiolas de confinamento, mantidas em estufa.
- Concluímos que as colônias alimentadas com as dietas proteicas (T<sub>1</sub>, T<sub>3</sub>, D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>) no campo mostraram um aumento na área de cria e no peso da colônia,

assim concluímos que é importante a utilização de dietas artificiais protéicas como forma de suplementação alimentar em períodos de escassez.

- A única dieta que não apresentou um bom desempenho nas colônias do campo foi a T<sub>2</sub>, isso se deve ao fato de que algumas dietas artificiais podem apresentar níveis nutricionais iguais ou até maiores do que o pólen, mas podem não ser palatáveis para as abelhas, que quando podem escolher entre as dietas artificiais e o pólen presente na natureza, optam pelo mesmo.
- Ao final desse trabalho podemos concluir que a os métodos utilizados para medir a eficiência da utilização de dietas artificiais como forma de suplementação alimentar para colônias de abelhas, é uma ferramenta importante no auxílio aos apicultores, para manter suas colonias nos períodos de escassez alimentar.

- ABBAS, T.; H. ABID & R. ALI. 1995. Black gram as a pollen substitute for honey bees. *Animal Feed Science and Technology* **54**: 357-359.
- ALLEN, M.D. & E.P. JEFFRE. 1956. The influence of stored pollen and of colony size on the brood rearing of honey bees. *Ann. App. Biol.* **44**: 649-656.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; L.C. PAMPLONA & S. COIMBRA. 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis* **18**: 105-111.
- AL-TIKRITY, W.S.; R.C. HILLMANN; A.W. BENTON & W.W. CLARKE, JR. 1971. A new instrument for brood measurement in a honey bee colony. *American Bee Journal* **111**: 20-26.
- AMDAM, G.V. & S.W. OMHOLT. 2002. The regulatory anatomy of honey bee lifespan. *Journal of Theoretical Biology* **216**: 209-228.
- AZEVEDO-BENITEZ, A.L.G. & R.H. NOGUEIRA-COUTO. 1998. Estudo de algumas dietas artificiais visando à produção de geléia real em colônias de *Apis mellifera*. In: III ENCONTRO SOBRE ABELHAS, Ribeirão Preto, SP, 227-230.
- BARKER, R.J. 1977. Some carbohydrates found in pollen and pollen substitutes are toxic to honey bees. *J. Nutr.* **107**: 1859-1862.
- BARKER, R.J. & Y. LEHNER. 1974. Acceptance and sustenance value of naturally occurring sugars fed to newly emerged adult workers of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Exp. Zool.* **187**: 277-285.

- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- BRANDEBURGO, M.A.M. & L.S. GONÇALVES. 1989. A influência de fatores ambientais no desenvolvimento de colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). *Revista Brasileira de Biologia* **49**: 1035-1038.
- BRODSCHNEIDER, R. & K. CRAILSHEIM. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* **41**: 278-294.
- BROUWERS, E.V.M. 1982. Measurement of hypopharyngeal gland activity in the honey bee. *Journal of Apicultural Research* **21**: 193-198.
- BITONDI, M.M.G.; Z.L.P. SIMÕES; A.M. NASCIMENTO & S.L. GARCIA. 1994. Variation in the hemolymph protein composition of confined *Apis mellifera* and partial restoration of vitellogenin titre by juvenile hormone analogue treatment. *J. Hymenoptera Res.* **3**: 107-117.
- COOK, S.M.; C.S. AWMACK; D.A. MURRAY & I.H. WILLIAMS. 2003. Are honeybees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological Entomology* **28**: 622-627.
- COUTO, L.A. 1998. Nutrição de abelhas. *In*: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, Salvador. BA, 92-95.
- CRAILSHEIM, K. 1990. The protein balance of the honey bee worker. *Apidologie* **21**: 417-429.

- CRAILSHEIM, K. 1991. Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Comparative Physiology* **161B**: 55-60.
- CRAILSHEIM, K. 1998. Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **29**: 97-112.
- CRAILSHEIM, K.; L.H.W. SCHNEIDER; N. HRASSNIGG; G. BÜHLMANN; U. BROSCHE; R. GMEINBAUER & B. SCHÖFFMANN. 1992. Pollen consumption and utilization in worker honey bees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *J. Insect. Physiol.* **38**: 409-419.
- CRAILSHEIM, K.; N. HRASSNIGG; R. GMEINBAUER; M.J. SZOLDERITS; L.H.W. SCHNEIDER & U. BROSCHE. 1993. Pollen utilization in non-breeding honey bees in winter. *J. Ins. Physiol.* **39**:369-373.
- CREMONEZ, T.M. 1996. Avaliação de métodos para determinação da eficiência de dietas protéicas em abelhas *Apis mellifera*. Dissertação de Mestrado apresentada à FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, 103 p.
- CREMONEZ, T.M. 2001. Influência da nutrição sobre aspectos da fisiologia e nutrição de abelhas *Apis mellifera*. Tese de Doutorado apresentada à FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, 87 p.
- CREMONEZ, T.M.; D. DE JONG & M.M.G. BITONDI. 1998. Quantification of hemolymph proteins as a fast testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* **91**: 1284-1289.
- DEGRANDI-HOFFMAN, G.; S.A. ROTH; G.L. LOPER; E.H.JR. ERICKSON. 1989. A honey bee population dynamics simulation model. *Ecol. Modeling* **45**:133-150.

- DE GROOT, A.P. 1953. Protein and amino acid requirements of the honeybees (*Apis mellifera* L.). *Physiol. Comp. Oecol* **3**: 197-285.
- DE JONG, D. 1977. Experimental enhancement of chalk brood infections. *Bee World* **57**: 114-115.
- DE JONG, D.; E.J. SILVA; P. KEVAN & J.L. ATKINSON. 2009. Pollen substitutes increase honey bee hemolymph protein levels as much as or more than does pollen. *Journal of Apicultural Research* **48**: 34-37.
- DECOURTYE A.; MADER E.; DESNEUX N. 2010. Landscape scale enhancement of floral resources for honey bees in agro-ecosystems, *Apidologie* **41**: 264-277.
- DIETZ, A. & H.R. STEVENSON. 1980. Influence of long term storage on the nutritional value of frozen pollen for brood rearing of honey bees. *Apidologie* **11**: 143-151.
- DOULL, K.M. 1980. Relationships between consumption of a pollen supplement, honey production, and brood rearing in colonies of honeybees *Apis mellifera* L. *Apidologie* **11**: 367-374.
- ELLIS, A.M. & G.W.JR. HAYES. 2009. An evaluation of fresh versus fermented diets for honey bees (*Apis mellifera*). *J. Apic. Res.* **48**: 215-216.
- ENGELS, W.; H. KAATZ; A. ZILLIKENS; Z.P. SIMÕES; A. TRUBE; R. BRAUN & F. DITTRICH. 1990. Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In: M. Hoshi and Yamashita (eds) *Advances in Invertebrate Reproduction* **5**: 495-502
- FREE, J.B. 1980. A organização social das abelhas (*Apis*) E.P.U., EDUSP, São Paulo, 79 p.



- FREE, J.B. & I.H. WILLIAMS. 1971. The effect of giving pollen and pollen supplement to honeybee colonies on the amount of pollen collected. *Journal of Apicultural Research* **10**: 87-90.
- FREITAS, B.M. 1991. Potencial da caatinga para a produção de pólen e néctar para exploração apícola. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 140 p.
- FREITAS, J. C. A.; ECHAZARRETA, C. 2001. Fuentes de proteína para suplementos de las abejas. In: *Seminário Americano de Apicultura*, 15 p. 48-53
- GARCIA, R.C.; L.A. COUTO; R.H. NOGUEIRA-COUTO & O.M. JUNQUEIRA. 1986. Níveis de proteína, lisina e metionina em rações para colônias de *Apis mellifera* infestadas com *Varroa jacobsoni*. *Ars Veterinari* **2**:147-151.
- GILLIAN, M. 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters* **155**: 1-10.
- GILLIAN, M. & K.K. JACKSON. 1972. Proteins of developing worker honey bees, *Apis mellifera*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **65**: 516-517.
- GONÇAVES, N.M. 1978. Estudo dos materiais superficiais da região de Ribeirão Preto – SP e suas relações com elementos morfológicos da paisagem. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Geociências-USP, São Paulo, 176 p.
- GREGORY, P.G. 2006. Protein diets and their effects on worker weight, longevity, consumption and hemolymph protein levels of *Apis mellifera*. *Proceedings of the American Bee Research Conference*, 2006.
- HAGEDORN, H.H. & F.E. MOELLER. 1968. Effect of the age of pollen used in pollen supplements on their nutritive value for the honey bee. I. Effect on thoracic

- weight, development of hypopharyngeal glands, and brood rearing. *J. Apic. Res.* **7**: 89-95.
- HAYDAK, M.H. 1935. Brood rearing by honey bees confined to a pure carbohydrate diet. *J. Econ. Entomol.* **28**: 657-660.
- HAYDAK, M.H. 1963. Influence of storage on the nutritive value of pollen for brood rearing by honeybees. *Journal of Apicultural Research* **2**: 105-107.
- HAYDAK, M.H. 1967. Bee nutrition and pollen substitutes. *Apiacta* **1**: 3-8.
- HAYDAK, M.H. 1970. Honey bee nutrition. *Ann. Rev. Entomol.* **15**: 143 – 156.
- HERBERT, E.W.JR.; W.G. BICKLEY & H. SHIMANUI. 1970. The brood rearing capacity of caged honey bees fed dandelion and mixed pollen diets. *J. Econ. Entomol.* **63**: 215-218.
- HERBERT, E.W.JR. 1992. Honey bee nutrition. *In: The Hive and The Honey Bee.* Graham, J. M. (ed), Dadant & Sons. Hamilton, Illinois, 197-233.
- HERBERT, E.W.JR. 2000. Honey bee nutrition. *In: Graham, J (ed). The hive and the honey bee.* Dadant and Co.; Hamilton, IL., USA. 197-224.
- HERBERT, E.W.JR.; H. SHIMANUKI & D. CARON. 1977. Optimum protein levels required by honey bees (Hymenoptera: Apidae) to initiate and maintain brood rearing. *Apidologie* **8**: 141-146.
- HERBERT, E.W.JR. & H. SHIMANUKI. 1978. Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee stored pollen. *Apidologie* **9**: 33-40.

- HERBERT, E.W.JR. & H. SHIMANUKI. 1979. Seasonal protein preferences of free flying colonies of honey bees. *American Bee Journal* **119**: 298-302.
- HERBERT, E.W.JR.; H. SHIMANUKI & B.S. SHASHA. 1980a. Brood rearing and food consumption by honey bee colonies fed pollen substitutes supplemented with starch encapsulated pollen extracts. *J. Apic. Res.* **19**: 115-118.
- HORR, B.Z. 1998. Salt – an important dietary supplement in honey bee nutrition? *American Bee Journal* **138**: 662-669.
- HRASSNIGG, N. & K. CRAILSHEIM. 2005. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera* L.), *Apidologie* **36**: 255 – 277.
- HUANG, Z.Y. & G.W. OTIS. 1989. Factors determining hypopharyngeal gland activity of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insects Sociaux* **36**: 264-276.
- HUANG, Z.Y. 2010. Honey Bee Nutrition. *American Bee Journal*. **150**: 773-776.
- HRASSNIGG, N. & K. CRAILSHEIM. 2005. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **36**: 255-277.
- JOHANSSON, T.S.K. & M.P. JOHANSSON. 1977. Feeding honeybees pollen and substitutes. *Bee World* **58**: 105-118.
- KERR, W.E. & J.F.M. FAVA. 1970. Contribuição para a apicultura migratória racional no Estado de São Paulo. *In*: 1º Congresso Brasileiro de Apicultura, Florianópolis, SC, 340 p.
- KNECH, D. & H.H. KAATZ. 1990. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie* **21**: 457-468.

- LEGLER, S. 2000. Alimentação artificial de abelhas. *In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA*, Florianópolis. SC, 98-102.
- LIMA, A.O.N. 1995. Pólen coletado por abelhas africanizadas em apiário comercial na caatinga cearense. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 118 p.
- MANNING R.; A. RUTKAY; L. EATON & B. DELL. 2007. Lipid-enhanced pollen and lipid-reduced flour diets and their effect on the longevity of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Aust. J. Entomol.* **46**: 251-257.
- MAYACK C. & NAUG. D. 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J. Invertebr. Pathol.* **100**: 185 - 188
- MATTILA, H.R. & G.W. OTTIS. 2006. Effects of pollen availability and *Nosema* infection during the spring on division of labour and survival of worker honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Environmental Entomology* **35**: 708-717.
- MEIKLE, W.G.; B.G. RECTOR; G. MERCADIER & N. HOLST. 2008. Within-day variation in continuous hive weight data as a measure of honey bee colony activity. *Apidologie* **39**: 694-707.
- MOELLER, F.E. 1958. Relation between egg-laying of queen bees populations and honey production of their colonies. *Am. Bee. J.* **98**: 401-402.
- MORSE, R.A. 1975. Bees and beekeeping. *Cornel University Press*, Ithaca, NY.
- NABORS, R.A. 1996. Using mixtures of different sugars to feed bees. *American Bee Journal* **135**: 785-786.

- NABORS, R.A. 2000. The effects of spring feeding pollen substitute to colonies of *Apis mellifera*. *Am. Bee J.* **140**: 322-323.
- NATION, J.L. & F.A. ROBINSON. 1971. Concentration of some major and trace elements in honey bees, royal jelly and pollens determined by atomic absorption spectrophotometry. *J. Apic. Res.* **10**: 35-43.
- NAUG, D. 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honey bee colony collapses. *Biol. Conserv.* **142**: 2369-2372.
- OLDROYD B.P. 2007. What's killing American honey bees? *Plos Biol.* **5**: e168.
- PEREIRA, F.M.; B.M. FREITAS; J.M.V. NETO; M.T.R LOPES; A.L. BARBOSA & R.C.R. CAMARGO. 2006. Desenvolvimento de colônias de abelhas com diferentes alimentos protéicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **41**: 1-7.
- PERNAL, S.F. & R.W. CURRIE. 2000. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie.* **31**: 387-409.
- PERNAL, S.F. & R.W. CURRIE. 2001. The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **51**: 53-68.
- ROULSTON, T.H. & J.H. CANE. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 187-209.
- STANDIFER, L.N.; G.D. WALLER; M.H. HAYDAK; M.D. LEVIN & J.P. MILLS. 1971. Stimulative feeding of honey bees colonies en Arizona. *J. Apic. Res.* **10**: 27-34.

- STANDIFER, L.N.; M.H. HAYDAK; J.P. MILLS & M.D. LEVIN. 1973. Value of three protein rations in maintaining honey bee colonies in outdoor flight cages. *Journal of Apiculture Research* **12**:137-143.
- STANGER, W. & H.H. LAIDLAW. 1974. Supplemental feeding of honeybees. *American Bee Journal* **114**: 138-141.
- SEELEY, T.D. 1989. The Honey bee colony as a superorganism, *Am. Sci.* 77: 546-553
- SCHMICKL, T. & K. CRAILSHEIM. 2001. Cannibalism and early capping: strategies of honey bee colonies in times of experimental pollen shortages. *J. Comp. Physiol.* **187**: 541-547.
- SCHMICKL, T. & K. CRAILSHEIM. 2002. How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behavior in response to non-foraging conditions and poor conditions. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **51**: 415-425.
- SCHMIDT, J.O. 1984. Feeding preference of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: apidae): individual versus mixed pollen species. *J. Kans. Entomol. Soc.* **57**: 323-327.
- SCHMIDT, J.O.; S.C. THOENES & M.D. LEVIN. 1987. Survival of honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), fed various pollen sources. *J. Econ. Entomol.* **80**: 176-183.
- SCHMIDT, J.O.; S.L. BUCHMAN & M. GLAIM. 1989. The nutritional value of *Typha latifolia* pollen for bees. *J. Apic. Res.* **8**: 155-165.
- SEREIA, M.J. 2009. Suplementos proteicos para abelhas africanizadas submetidas à produção de geléia real. Tese de doutorado apresentada à Univesidade Estadual de Maringá, PR, 90 p.

- SILVA, F.T.A. 1997. Comparação entre pasta de soja (*Glycine max*) e pasta de jatobá (*Hymenaea spp.*) como alimentação suplementar para *Apis mellifera*. Monografia apresentada à Universidade Federal do Piauí, Terezina, 16 p.
- SIMPSON, S.J. & D. RAUBENHEIMER. 1993. The central role of the hemolymph in the regulation of nutrient intake in insects. *Physiological Entomology* **18**: 395-403.
- SOMERVILLE, D. 2005. *Fat bees skinny bees – a manual on honey bee nutrition for beekeepers*. NSW Department of Primary Industries. RIRDC Publication Nº 05/054. [www.rirdc.gov.au](http://www.rirdc.gov.au)
- SYMAS B.; JEDRUSK A. (2003). The influence of different diets on haemocytes of adult worker honeybees, *Apis mellifera*. *Apidologie* **34**: 97-102
- VAN DER ENGELSDORP, D.; J.D. EVANS; C. SAEGERMANN; C. MULLIN; E. HAUBRUGGE; B.K. NGUYEN; M. FRAZIER; J. FRAZIER; D. COX-FOSTER; Y. CHEN; R. UNDERWOOD; D.R. TARPY & J.S. PETTIS. 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS ONE* **4**: e6481.
- VAN DER STEEN, J. 2007. Effect of hone-made pollen substitute on honey bee colony development. *J. Apic. Res.* **46**: 114-119.
- VÁSQUEZ, A. & T.C. OLOFSSON. 2009. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J. Apic. Res.* **48**: 189-195.
- WINSTON, M.L.; O.R. TAYLOR & G.W. OTIS. 1983. Some differences between temperate European and tropical African and South American honeybees. *Bee World* **64**: 12 - 21.
- WINSTON, M.L. 1987. *The biology of the honey bee*. . Harvard University Press, Cambridge, MA.

ZUCOLOTO, F.S. 1994. Aspectos gerais da nutrição de insetos, com especial referência em abelhas. *In: I ENCONTRO SOBRE ABELHAS*, Ribeirão Preto, SP, 27-37.