



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0621901-2 A2**

BRPI0621901A2

(22) Data de Depósito: 15/12/2006

(43) **Data da Publicação:** 20/12/2011
(RPI 2137)

(51) **Int.Cl.:**

A61K 31/23

A01G 7/00

A01K 51/00

C09K 15/06

(54) **Título:** MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS E COMPOSIÇÃO DE FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS

(30) **Prioridade Unionista:** 07/09/2006 US 11/470762

(73) **Titular(es):** PHERO TECH INC.

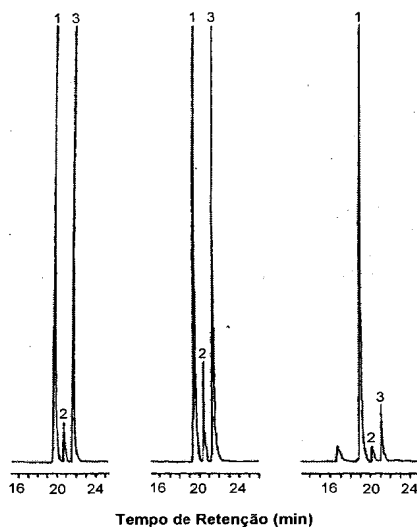
(72) **Inventor(es):** TANIA PANKIW

(74) **Procurador(es):** Tinoco Soares & Filho S/C Ltda.

(86) **Pedido Internacional:** PCT CA2006002066 de
15/12/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/028269 de
13/03/2008

(57) **Resumo:** MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS E COMPOSIÇÃO DE FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS, a invenção se refere a um feromônio sintético estabilizado para a ninhada de abelhas e métodos para estabilizar o feromônio da ninhada de abelhas melíferas, assim possibilitando a produção e o uso sustentado de produtos comerciais baseados nesse feromônio; o feromônio sintético estabilizado pode ser usado para manipular o comportamento e melhorar o desempenho de abelhas operárias melíferas, resultando em um maior vigor da colmeia em geral; a composição do feromônio sintético estabilizado para abelhas melíferas compreende dois ou mais ésteres entre: linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de etila, palmitato de etila, estereato de etila, linoleato de metila, linolenato de metila, oleato de metila, palmitato de metila e estearato de metila e um anti-oxidante.



"MÉTODO DE ESTABILIZAR UM
FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS E
COMPOSIÇÃO DE FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS
MELÍFERAS"

5 CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção se refere a um
feromônio estabilizado de abelhas melíferas e a métodos de
estabilizar o feromônio de ninhada de abelhas melíferas,
assim possibilitando a produção e uso sustentado de produtos
10 comerciais baseados nesse feromônio. O feromônio
estabilizado pode ser usado para manipular o comportamento e
melhorar o desempenho de abelhas operárias melíferas,
resultando em um maior vigor da colmeia em geral. Os
comportamentos específicos influenciados pelo feromônio
15 estabilizado aplicado em um substrato inerte incluem: idade
da primeira busca de alimento, proporção das operárias
forrageiras, proporção das forrageiras de pólen diante das
forrageiras de néctar, carregamento de pólen por abelhas
individuais, eficiência da polinização das safras-alvo,
20 consumo de componentes dietéticos suplementares e de
antibióticos, criação das operárias e propensão ao
enxameamento. O feromônio estabilizado também pode ser usado
para influenciar o desenvolvimento da glândula alimentícia
hipofaríngea e a produção de proteína pela glândula. O
25 feromônio forrageador estabilizado também pode ser usado em
conjunção com o feromônio da glândula mandibular da abelha
rainha melífera, particularmente para influenciar a
polinização das plantas da safra-alvo.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

A hipótese de que abelhas melíferas larvais produzem um feromônio que estimula a procura de alimento (Filmer 1932; Free 1967) foi testada e verificada por Pankiw et al. (1998), que constataram um aumento de 2,5 vezes no número de forrageiras de pólen quando colônias com 1.000 larvas foram providas com extratos de hexano de 2.000 larvas de abelhas melíferas. Em colônias sem larvas, o extrato substituiu as larvas como fonte de feromônio.

Pankiw e Page (2001) e Page e Pankiw (2002) testaram uma mistura de feromônio sintético que compreendeu dez ésteres de ácidos graxos (LeConte et al. 1990) nas seguintes percentagens: linoleato de etila, 1%; linolenato de etila, 13%; oleato de etila, 8%; palmitato de etila, 3%; estereato de etila, 7%; linoleato de metila, 2%; linolenato de metila, 21%; oleato de metila, 25%; palmitato de metila, 3%; e estereato de metila, 17%. Esta mistura reduziu o limiar da resposta neurosensorial à sacarose nas abelhas operárias. As abelhas operárias melíferas com baixo limiar de resposta à sacarose têm mais probabilidade de saírem em busca de pólen, enquanto que aquelas com limiares elevados de resposta têm mais probabilidade de saírem em busca de néctar (Pankiw e Page 2000; Pankiw 2003; Pankiw et al. 2004^a). Uma hora após ser colocado no centro de uma colônia, o extrato larval ou a mistura de feromônio sintético de ninhada aumentou a proporção de forrageiras de pólen diante das não-pólen nas colônias em uma plantação de

amêndoas. Pankiw e Page (2001) sugerem que "o feromônio de ninhada modula o limiar de resposta nas pré-forrageiras, preparando-as para serem forrageiras de pólen e liberando o comportamento forrageiro de pólen".

5 Pankiw et al. (2004b) expuseram diariamente colônias de abelhas melíferas ao feromônio sintético de ninhada equivalente a 2.000 larvas (1,12 mg) durante 28 dias. Além de aumentar o número de forrageiras de pólen, o feromônio de ninhada aumentou
10 significativamente o peso das cargas de pólen levadas à colmeia. Colônias tratadas com feromônio criaram uma ninhada significativamente maior, e o número de abelhas melíferas adultas que emergiram dessa ninhada aumentou.

A uma dose biologicamente
15 realista equivalente a 2.000 larvas, o feromônio de ninhada recrutou operárias melíferas para se tornarem forrageiras em uma idade anterior à de suas equivalentes nas colônias de controle (Pankiw et al. 2004a); a uma dose equivalente a 6.200 larvas, o feromônio de ninhada protelou o recrutamento
20 das operárias para se tornarem forrageiras (LeConte et al. 2000).

Embora a exposição ao feromônio de ninhada em geral tenha reduzido a idade da primeira busca por alimento, o início dessa busca foi
25 protelado em uma coorte especializada de abelhas operárias que tinham um conteúdo bastante elevado de proteína em suas glândulas hipofaríngeas (Pankiw et al. 2004a). Esse alto nível de proteína indica uma maior probabilidade de

comportamento de criação de ninhada e uma qualidade correspondentemente mais elevada de proteína fornecida às larvas em comparação com as colônias de controle.

Pankiw (2004b) constatou que a
5 proporção de forrageiras de pólen para as de não-pólen aumentou após uma hora de exposição ao feromônio sintético de ninhada equivalente a 2.000 larvas. As forrageiras das colônias tratadas com feromônio retornaram com cargas de pólen mais pesadas do que as forrageiras das colônias de
10 controle, e esse pólen tinha 43% mais probabilidade de originar-se da safra-alvo dentro da qual as colônias foram colocadas para garantir a polinização. As forrageiras de néctar, que podem visitar e polinizar mais flores do que as forrageiras de pólen, apresentaram mais grãos de pólen em
15 seus corpos do que as forrageiras de néctar de colônias de controle não-tratadas. Essas forrageiras de não-pólen transportaram pólen com 54% mais de probabilidade de originar-se da safra-alvo do que o pólen transportado por forrageiras de néctar a partir das colônias de controle. Ao
20 aumentar a atividade tanto das forrageiras de pólen como de não-pólen, o feromônio de ninhada tem o potencial de aumentar consideravelmente a eficácia das colônias usadas para polinizar as safras-alvo.

Os apicultores normalmente
25 fornecem um suplemento protéico no inverno ou em princípios da primavera para promover o crescimento da colônia (Herbert 1992). Com frequência, um antibiótico é misturado ao suplemento protéico como profilático contra doenças

bacterianas. Já que as larvas produtoras de feromônios estão ausentes ou em seus níveis mais baixos em fins do inverno e princípios da primavera, a administração de feromônios de ninhada dentro de uma colônia poderia estimular o consumo de suplementos dietéticos de proteínas e antibióticos, bem como um desenvolvimento glandular hipofaríngeo e a biossíntese da proteína.

Page e Pankiw (2002) ensinam que "o feromônio sintético de ninhada é facilmente oxidável e deve ser armazenado em condições de baixo oxigênio, preferivelmente a -20°C e, mais preferivelmente, a -70°C se for armazenado por um longo período de tempo". Porém, é possível que nem mesmo o congelamento estabilize o feromônio. Por exemplo, o extrato larval bruto de abelhas melíferas perdeu toda a atividade feromonal após apenas três meses em um congelador de laboratório. (T. Pankiw, Universidade A&M do Texas, observação inédita). Desse modo, qualquer produto comercial que incorporou feromônio natural ou sintético poderia quase não ter vida útil, mesmo estando congelado. Reconhecendo a instabilidade do feromônio sintético, os pesquisadores têm fornecido invariavelmente a suas abelhas experimentais feromônios frescos todos os dias, normalmente em placas de vidro (Pankiw et al. 1998; Pankiw e Page 2001; Page e Pankiw 2002; Pankiw e Rubink 2002; Pankiw et al. 2004b). No uso operacional, a aplicação diária de feromônio não seria prática e seria dispendiosa, além de não eliminar a necessidade de congelamento durante o armazenamento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção é dirigida a um método de estabilizar o feromônio de ninhada de abelhas melíferas formado de dois ou mais ácidos carboxílicos de cadeia longa como, por exemplo, ácidos carboxílicos com comprimento entre C16 e C20 ou seus ésteres de metila ou etila, especialmente dois ou mais de linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de etila, palmitato de etila, estearato de etila, linoleato de metila, linolenato de metila, oleato de metila, palmitato de metila e estearato de metila, incorporando um anti-oxidante no feromônio.

O anti-oxidante pode ser de grau alimentício. Particularmente, o anti-oxidante de grau alimentício pode ser selecionado a partir do grupo compreendido (entre outros) de hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, hidroquinona de butila terciária, glicol de polipropileno, ácido cítrico e vitamina E e seus derivados (tocoferóis) ou qualquer combinação de dois ou mais desses anti-oxidantes.

No método, o anti-oxidante atua inibindo a decomposição do linoleato de metila, linolenato de metila, linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de metila e oleato de etila.

Em outro aspecto, a invenção é dirigida a uma composição formada de dois ou mais elementos entre linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de etila, palmitato de etila, estereato de etila, linoleato de metila, linolenato de metila, oleato de metila, palmitato de

metila, estearato de metila e um ou mais anti-oxidantes de grau alimentício selecionado de um grupo formado (entre outros), por hidroxianisol butilado, hidroxitoluleno butilado, hidroquinona de butila terciária, glicol de polipropileno, ácido cítrico e vitamina E e seus derivados (tocoferóis) para a administração em abelhas melíferas ou em colônias de abelhas melíferas.

As proporções por peso dos componentes da composição podem ser o linoleato de etila (0,1-50%), linolenato de etila (1,3-50%), oleato de etila (0,8-50%), palmitato de etila (0,3-50%), estearato de etila (0,7-50%), linoleato de metila (0,2-50%), linolenato de metila (0,2-50%), oleato de metila (0,3-50%), palmitato de metila (0,3-50%), estearato de metila (1,7-50%) e anti-oxidante (0,001-50%).

A composição da forma descrita pode ser administrada em abelhas melíferas, em colônias de abelhas melíferas ou em unidades de polinização em um substrato inerte selecionado dentre o grupo formado de parafina, cera vegetal, cera de abelha, sílica, alumina, celulose, celulose modificada (papel e produtos de papel), tecido seco de plantas, madeira ou um polímero sintético.

O método e a composição podem ser usados para aumentar a proporção das forrageiras de pólen diante das de não-pólen entre as abelhas operárias melíferas, ou usados para reduzir ou protelar a idade da primeira busca de alimentos por abelhas operárias melíferas forrageiras, ou usados para aumentar o número total de

abelhas operárias melíferas forrageiras, ou usados para
aumentar o peso da carga de pólen levada à colônia de
abelhas operárias melíferas forrageiras de pólen, ou usadas
para aumentar o número de grãos de pólen carregados nos
5 corpos das abelhas operárias melíferas forrageiras de não-
pólen, ou usadas para aumentar a polinização da safra-alvo
perto ou dentro da qual as colônias de abelhas ou unidades
de polinização estão situadas, ou usadas para estimular o
desenvolvimento da glândula alimentícia de ninhada e a
10 produção de proteínas glandulares nas abelhas operárias
melíferas, ou usadas para estimular o consumo de proteína
dietética ou outros componentes dietéticos e suplementos
antibióticos por parte de abelhas melíferas.

No método, a administração
15 contínua da composição em uma colônia de abelhas melíferas
por um período de aproximadamente duas semanas ou mais pode
ser usada para aumentar o número de abelhas criadas na
colônia ou usada para inibir a evasão (enxameamento) de
abelhas da colônia.

20 No método, a composição pode
ser administrada em abelhas melíferas, em colônias de
abelhas melíferas ou em unidades de polinização em
combinação com o feromônio sintético da glândula mandibular
da abelha-rainha melífera administradas em abelhas
25 melíferas, em colônias de abelhas melíferas ou em unidades
de polinização ou em plantas em florescência em que uma
polinização intensificada é desejável.

DESENHOS

a figura 1 ilustra os traços cromatográficos de gás das misturas de oleato de metila 1, linoleato de metila 2 e linolenato de metila 3, formulados com o anti-oxidante estabilizador hidroquinona de butila terciária na hora zero e duas semanas após a exposição ao ar à temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), em comparação com uma formulação idêntica, porém não estabilizada, após uma exposição de duas semanas a 20°C;

a figura 2 ilustra o traçado cromatográfico das misturas de oleato de etila 1, linoleato de etila 2 e linolenato de etila 3, formulados com o estabilizador anti-oxidante hidroquinona de butila terciária na hora zero e duas semanas após a exposição ao ar à temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), em comparação com uma formulação idêntica, porém não estabilizada, após duas semanas de exposição a 20°C;

a figura 3 ilustra o traçado cromatográfico de gás da mistura de oleato de etila 1, linoleato de etila 2 e linolenato de etila 3, formulada com o estabilizador anti-oxidante hidroquinona de butila terciária após 20 semanas de exposição ao ar à temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), em comparação com o traçado de uma formulação idêntica, porém não estabilizada, após 20 semanas de exposição a 20°C; e

a figura 4 ilustra o traçado cromatográfico do gás da mistura de oleato de etila 1, linoleato de etila 2, linolenato de etila 3, palmitato de etila 4 e estearato de etila 5 formulada com o estabilizador anti-oxidante hidroquinona de butila terciária após 72 semanas de exposição ao ar à temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), em comparação com o traçado de uma formulação idêntica, porém não estabilizada, após 72 semanas de exposição a 20°C.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O feromônio de busca de alimento das abelhas melíferas é facilmente oxidável e instável à temperatura ambiente, perde a bioatividade rapidamente e deve ser mantido sob baixas condições de oxigênio e preferivelmente congelado a temperaturas bastante baixas, por ex., -70°C, se tiver que ser armazenado por longos períodos. Sob condições normais, qualquer produto baseado no feromônio praticamente não tem prazo de validade e não é viável comercialmente. Assim, à parte do uso do feromônio em pesquisa, não tem havido aplicação comercial do feromônio.

Descobrimos que o feromônio de ninhada das abelhas melíferas pode ser estabilizado por um período substancial de tempo com a incorporação de um anti-oxidante, particularmente um anti-oxidante de grau alimentício, no feromônio. As formulações de feromônio estabilizado de ninhada podem ser levadas à colméia em um

substrato inerte. Usado sozinho ou com o feromônio mandibular da abelha rainha melífera, o feromônio de ninhada pode melhorar o desempenho das abelhas operárias melíferas e aumentar o vigor geral da colmeia.

5 Em termos gerais, a invenção é dirigida a um método de estabilização do feromônio da ninhada de abelhas melíferas utilizando um ou mais anti-oxidantes aceitáveis, especialmente um ou mais anti-oxidantes de grau alimentício, incluindo, entre outros,
10 hidroxianisol butilado, hidroxitoluleno butilado, hidroquinona de butila terciária, glicol de polipropileno, ácido cítrico e vitamina E e seus derivados. Formulações do feromônio de dez componentes que incluem um anti-oxidante podem ser administrados de maneira sustentada em uma colmeia
15 em um substrato inerte.

Utilizando o estabilizador anti-oxidante hidroquinona de butila terciária, descobrimos que certos componentes instáveis de feromônio, particularmente linoleato de metila, linolenato de metila,
20 linoleato de etila e linolenato de etila, porém também incluindo oleato de metila e oleato de etila, permanecem intactos por 72 meses. Também descobrimos que uma formulação estabilizada com hidroquinona de butila terciária permaneceu em bioatividade por 231 dias, enquanto que uma formulação
25 não-estabilizada perdeu quase toda a bioatividade após 123 dias. Também descobrimos que o feromônio estabilizado de ninhada aumenta a busca por pólen entre as abelhas operárias melíferas e estimula o consumo dietético do pólen.

Finalmente, descobrimos que uma formulação de feromônio estabilizado de ninhada empregando componentes de grau técnico, com uma composição que varia ligeiramente da composição natural atingida com componentes de grau de reagentes, tem o mesmo efeito biológico que uma formulação de grau de reagente. Tal durabilidade e robustez possibilita o desenvolvimento e uso sustentado de produtos comerciais baseados no feromônio estabilizado de ninhada com anti-oxidantes de grau alimentício.

Esta invenção também se refere a composições em que dois dos dez componentes do feromônio, formado de palmitato de metila, palmitato de etila, estearato de metila, estearato de etila, oleato de metila, oleato de etila, linoleato de metila, linoleato de etila, linolenato de metila e linolenato de etila são formulados em quantidades efetivas com anti-oxidantes de grau alimentício, incluindo (entre outros) hidroxianisol butilado, hidroxitoluleno butilado, hidroquinona de butila terciária, glicol de polipropileno, ácido cítrico e vitamina E e seus derivados. Essas composições podem ser administradas às abelhas melíferas dentro de uma colmeia em um substrato inerte, incluindo (entre outros) parafina, cera vegetal, cera de abelha, sílica, alumina, celulose, celulose modificada (papel e produtos de papel), tecido seco de plantas, madeira ou um polímero sintético. Essas composições podem ser usadas para manipular o comportamento das abelhas operárias melíferas, incluindo (entre outros): uma maior proporção de forrageiras de pólen diante das de não-pólen,

redução da idade da primeira busca de alimento, indução do comportamento forrageiro, estímulo à coleta de pólen e transporte de pólen de volta para a colmeia, estimulando o consumo de componentes dietéticos e antibióticos
 5 suplementares, inibindo o enxameamento e melhorando a polinização das safras-alvo. As composições dos feromônios estabilizados também podem ser usadas para estimular o desenvolvimento e produção de proteína pela glândula alimentícia hipofaríngea. A aplicação combinada de
 10 composições de feromônio estabilizado de ninhada e do feromônio da glândula mandibular da abelha-rainha pode ser usada para melhorar as condições dentro da colmeia e aprimorar a polinização das safras-alvo.

Exemplo 1

15 Formulação

Devido à possibilidade de
 adulteração do mel, apenas anti-oxidantes de grau alimentício foram considerados como estabilizadores em potencial. O feromônio de ninhada foi formulado com
 20 hidroquinona de butila terciária como um estabilizador de teste nas proporções (percentagens peso/peso) e quantidades como seguem: palmitato de metila 3% (0,0225 g), palmitato de etila, 3% (0,0225 g), estearato de metila, 17% (0,1275 g), oleato de metila, 24,95% (0,1871 g), estearato de etila, 7% (0,0525 g), oleato
 25 de etila, 8% (0,0600 g), linoleato de metila, 2% (0,0150 g), linoleato de etila, 1% (0,0075 g), linolenato de metila, 21% (0,1575 g), linolenato de etila, 13% (0,0975 g) e hidroquinona de butila terciária, 0,05% (0,0004 g).

Os componentes foram misturados a aproximadamente 20°C na ordem acima com o emprego de um agitador magnético, sendo misturados até se tornarem homogêneos, resultando em 7,5 g do produto.

5 Exemplo 2

Estabilidade Química

Estudos de estabilidade de curto e longo prazo foram realizados com misturas simplificadas de componentes do feromônio de ninhada potencialmente instáveis misturadas com cerca das mesmas proporções que no Exemplo 1. A avaliação de curto prazo de uma duração de duas semanas foi realizada para misturas de oleato de metila, linoleato de metila e linolenato de metila, bem como de oleato de etila, linoleato de etila e linolenato de etila, cada qual com e sem hidroquinona de butila terciária. Foram realizados testes durante vinte semanas com misturas idênticas como se fossem para os experimentos de duas semanas, porém os testes de 72 semanas continham palmitato de metila e etila e estearato acrescentados nas proporções apropriadas às suas respectivas misturas. Aproximadamente 250 mg de uma mistura foram colocados em um recipiente de plástico de 4mL e 15 x 45mm (Chromatographic Specialties) equipado com uma tampa parafusada de inserção de difusão (Agilent Technologies) com um orifício de 1 mm de diâmetro para permitir a circulação do ar sobre a amostra. Todas as misturas foram mantidas a uma temperatura constante de 30°C.

Para análise por cromatografia de gás capilar, aproximadamente 1mg de uma mistura foi dissolvido em 1mL de éter de dietila, sendo analisada uma taxa de 1µL de cada extrato. As análises foram realizadas na primeira hora e após a duração dada à exposição ao ar a 30°C, utilizando um cromatógrafo de gás Hewlett Packard HP5890, equipado com um detector de ionização de chamas e uma coluna capilar BPX-70 de 30 m de comprimento (J&W Scientific). As temperaturas do injetor e do detector foram de 260°C e 285°C, respectivamente. O programa da temperatura foi de 80°C, elevando-se em 5°C por minuto durante 24 minutos até chegar a 200°C, passando então a subir a 20°C por minuto durante 3 minutos até atingir 260°C.

Resultados de duas semanas são fornecidos para os ésteres de metila e etila (Figuras 1 e 2), enquanto que resultados de longo prazo de 20 semanas e 72 semanas são fornecidos apenas para os ésteres de etila (Figuras 3 e 4). Resultados de longo prazo para ésteres de metila foram virtualmente idênticos aos dos ésteres de etila.

Após duas semanas, a composição proporcional dos ésteres de metila na mistura, que foi estabilizada com hidroquinona de butila terciária, permaneceu a mesma que a mistura não-estabilizada na hora zero (Figura 1). Entretanto, na mistura não-estabilizada, após duas semanas, a quantidade de linoleato de metila caiu em 85% e a quantidade de linolenato de metila caiu em 90%. Devido à decomposição dos outros componentes, a composição

proporcional de oleato de metila elevou-se de 48% da mistura total para 82%. Resultados similares foram obtidos com os ésteres de etila após duas semanas. A quantidade de linoleato de etila caiu em 74% e a quantidade de linolenato de etila caiu em 94%, enquanto que o oleato de etila subiu de 40% da mistura total para 66% (Figura 2). Esses resultados indicam que a decomposição do linoleato e linolenato de metila e de etila ocorre rapidamente à temperatura ambiente, provavelmente resultando na perda total da bioatividade de toda a mistura do feromônio após 2-4 semanas. Os resultados também indicam que, sem estabilização, o prazo de validade de qualquer produto de feromônio de ninhada seria inaceitavelmente curto.

Após 20 e 72 semanas a 20°C, a composição proporcional do oleato de etila, de linoleato de etila e de linolenato de etila nas misturas estabilizadas (Figuras 3 e 4, respectivamente) permaneceram essencialmente as mesmas que a mistura estabilizada após a exposição de duas semanas (Figura 2). Por contraste, após 20 semanas, nenhum linoleato de etila nem linolenato de etila havia permanecido na mistura não-estabilizada, e a quantidade de oleato de etila havia aumentado apenas ligeiramente de 37% para 43% da mistura total, apesar da completa ausência dos dois outros grandes componentes (Figura 3). Isto indica a decomposição completa do linoleato de etila e do linolenato de etila após 20 semanas de exposição, além de sugerir a decomposição parcial do oleato de etila.

Conforme era esperado dos resultados na Figura 3, nenhum linoleato de etila ou linolenato de etila permaneceu após 72 semanas de exposição à temperatura ambiente, indicando uma total decomposição desses dois componentes do feromônio (Figura 4). As composições percentuais de palmitato de etila e de estearato de etila aumentaram de 8% e 23% para 20% e 57%, respectivamente, sugerindo que não houve qualquer decomposição mesmo após 72 semanas. Entretanto, a percentagem de oleato de etila caiu de 24% para 10%. Juntamente com os resultados após 20 semanas, esse declínio confirma uma lenta decomposição de oleato de etila nas formulações não-estabilizadas.

Esses resultados indicam que a estabilização do feromônio da ninhada de abelhas melíferas com hidroquinona de butila terciária não irá resultar na decomposição de qualquer componente de feromônio não-estável por bem mais de um ano. A ausência de mesmo uma ligeira indicação de decomposição após 72 semanas (Figura 4) sugere que o prazo de validade de uma formulação estabilizada de feromônio será de pelo menos dois anos. Esta duração é suficientemente longa para justificar o desenvolvimento de um produto comercial.

Exemplo 3

25 Longevidade do Feromônio Estabilizado de Ninhada

Medida pelo Limiar de Resposta de Sacarose

As abelhas melíferas respondem reflexivamente estendendo a probóscide quando uma queda da

solução de sacarose é aplicada às antenas. Isto é chamado de avaliação da sacarose pelo limiar de resposta da extensão da probóscide (PER-RT). A avaliação consiste de um curso de concentração da sacarose de 0,1, 0,3, 1, 3, 10 e 30% (wt/vol), correspondendo a uma série logarítmica de -1, -0,5, 0, 0,5, 1 e 1,5. A antena de cada abelha é tocada uma vez com uma gotícula de sacarose. A concentração mais baixa que causa a extensão da probóscide é interpretada como uma estimativa do limiar de resposta individual à sacarose (Page et al. 1998; Pankiw e Page 1999). Os resultados da avaliação PER com concentrações ascendentes de sacarose são transformados em classificações de sacarose. Uma classificação PER é relacionada diretamente com o limiar de resposta de uma abelha individual, já que a maioria das abelhas continua a responder a todas as concentrações crescentes de sacarose após a resposta inicial. Uma classificação PER de 6, em que uma abelha individual responde a todas as 6 concentrações de sacarose, começando com 0,1% de sacarose na avaliação PER, representa um limiar de resposta 300 vezes mais baixo que uma classificação 1, em que um indivíduo responde apenas a 30% de sacarose. O limiar de resposta (RT) de uma abelha individual é uma "janela" para o sistema neurosensorial relacionado com o comportamento forrageiro (Pankiw e Page 2000) e com a idade (Pankiw e Page 1999; Pankiw 2003), sendo modulado pelo feromônio da ninhada. (Pankiw e Page 2001, 2003). Usamos a avaliação PER-RT à sacarose como um método de avaliar a bioatividade do

feromônio estabilizado de ninhada armazenado por vários períodos à temperatura ambiente.

Abelhas melíferas de pelo menos seis fontes não-relacionadas do "tipo selvagem" foram emersas durante 3h de suas colmeias em uma incubadora mantida a 33°C e 55% RH. Trezentas abelhas recém-emersas foram colocadas aleatoriamente em gaiolas com rede de plexiglás (14,6 x 10 x 7,7 cm). As gaiolas foram providas com uma solução de sacarose a 30%, água ad libitum e colocadas nas condições da incubadora acima. Gaiolas individuais foram selecionadas aleatoriamente para os seguintes tratamentos: 1) feromônio não-estabilizado de ninhada armazenado à temperatura ambiente; 2) feromônio estabilizado de ninhada com hidroquinona de butila terciária e armazenado à temperatura ambiente; 3) feromônio não-estabilizado de ninhada recém-preparado e 4) um controle sem feromônio. A composição do feromônio preparado foi: linoleato de etila, 1%; linolenato de etila, 13%; oleato de etila, 8%; palmitato de etila, 3; estearato de etila, 7%; linoleato de metila, 2%; linolenato de metila, 21%; oleato de metila, 25%; palmitato de metila, 3%; e estearato de metila, 17%. Gaiolas tratadas com feromônio receberam o equivalente a 300 larvas (LEq) por dia (proporção de 1:1 de feromônio de ninhada e abelhas). O feromônio foi formulado em isopropanol, de forma que 300 LEq foram entregues em aproximadamente 15 µL de solução. As gaiolas de controle receberam um volume igual de isopropanol por dia. Tratamentos respectivos foram entregues diariamente em uma

placa de vidro (7x 8 cm) depois que o isopropanol evaporou. As abelhas foram criadas da forma acima durante seis dias e então testadas quanto ao seu limiar de resposta à sacarose conforme descrito acima. Este protocolo foi seguido no 48°, 123° e 231° dia após a preparação de formulações não-estabilizadas e estabilizadas do feromônio da ninhada. Entre os tratamentos, as classificações foram comparadas com o uso dos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

O feromônio estabilizado de ninhada demonstrou uma bioatividade não diferente do feromônio de ninhada recém-formulado (Tabela 1). As abelhas melíferas expostas ao feromônio estabilizado de ninhada demonstraram consistentemente um limiar de resposta à sacarose pelo menos 1,75 vezes mais elevado do que a resposta das abelhas não-expostas nas gaiolas de controle. Ademais, a resposta à sacarose das abelhas melíferas ao feromônio de ninhada não-estabilizado armazenado à temperatura ambiente por 48, 123 e 231 dias não foi significativamente diferente da das abelhas de controle não expostas ao feromônio.

Esses resultados demonstraram que o feromônio estabilizado de ninhada demonstra uma bioatividade de longo prazo quando armazenado à temperatura ambiente. Esta bioatividade é estatisticamente a mesma que a induzida pelo feromônio de ninhada recém-formulado. Os resultados também indicam que a adição de hidroquinona de butila terciária aos dez componentes de feromônio não tiveram efeito sobre a bioatividade do feromônio.

Tabela 1. Bioatividade do feromônio não-estável e estabilizado armazenado à temperatura ambiente versus feromônio de ninhada recém-formulado como percentagem da resposta de sacarose por abelhas melíferas mantidas em um meio-ambiente de controle sem feromônio.

Dias à temperatura ambiente	Feromônio instável de ninhada %	Feromônio estabilizado de ninhada %	Feromônio instável de ninhada recém-formulado
48	17,0 (P>0,05)	88,1 (P<0,01)	78,7 (P<0,001)
123	6,8 (P>0,05)	75,6 (P<0,001)	68,5 (P<0,001)
231	3,7 (P>0,05)	89,7 (P<0,0001)	91,0 (P<0,0001)

Exemplo 4

Feromônio de Ninhada Formulado a Partir de Liberações de Ácidos Graxos de Grau de Reagente e Grau Técnico de Abelhas Melíferas Forrageiras de Pólen

Todas as formulações anteriores de feromônios de ninhada compreenderam compostos de grau de reagentes superiores a 99% de pureza fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). Os compostos de grau de reagente são utilizados mais comumente como padrões na identificação química para a síntese química ou em qualquer outra aplicação em que a pureza é essencial. No entanto, a quantidade da pureza é diretamente proporcional ao custo de um composto. Uma forma de reduzir o custo do feromônio de ninhada está em formulá-lo usando componentes menos puros de grau técnico. Embora o custo seja significativamente reduzido com componentes de grau técnico, há um preço. Os componentes de grau técnico derivam de fontes naturais que contêm misturas de ácidos graxos que não estão nas exatas proporções do feromônio natural da ninhada.

por duas pessoas, totalizando quatro contagens de cinco minutos por colônia. Essas pessoas nada sabiam do tratamento.

Os dados das contagens foram analisados com o uso da Análise da Tabela de Contingência. Comparadas ao controle em branco sem feromônio, tanto a formulação de grau técnico ($\chi^2 = 7,0$, $df = 1$, $P < 0,01$) como a de grau de reagente ($\chi^2 = 15,0$, $df = 1$, $P < 0,0001$) induziram proporções significativamente maiores de forrageiras com pólen diante das forrageiras de não-pólen que entravam nas colônias (Tabela 3). A formulação de grau de reagente liberou uma proporção ligeiramente mais alta de forrageiras de pólen do que a formulação de grau técnico ($\chi^2 = 3,9$, $df = 1$, $P = 0,048$).

Duas constatações pertinentes surgem deste estudo. Primeiramente, o feromônio estabilizado de ninhada de qualquer grau é capaz de induzir uma busca aprimorada por pólen cerca de 116% superior ao controle sem feromônio, apenas 3,5% menos que a formulação induzida pelo grau de reagente. Assim, a um custo de apenas 7% da formulação do grau de reagente, o feromônio de ninhada formulado de grau técnico estabilizado com hidroquinona de butila terciária parece ser um produto eficaz e economicamente viável.

Tabela 2. Formulação de feromônio de ninhada de grau de reagente e de grau técnico

Composto	Ésteres de ácido graxo de grau de reagente + 0,05% de hidroquinona de butila terciária (% dos ésteres totais)	Ésteres de ácidos graxos de grau técnico + 0,05% hidroquinona de butila terciária (% de ésteres totais)
Palmitato de Metila	3,00	2,03
Palmitato de Etila	3,00	4,23
Estearato de Metila	17,00	15,17
Oleato de Metila	25,00	25,04
Estearato de Etila	7,00	8,88
Oleato de Etila	8,00	6,72
Linoleato de Metila	2,00	8,63
Linoleato de Etila	1,00	3,5
Linolenato de Metila	21,00	17,07
Linolenato de Etila	13,00	8,73

Tabela 3. Proporção de forrageiras de pólen diante das não-pólen que entram nas colônias em um período de 5 minutos.

Tratamento	Proporção de forrageiras com pólen/não-pólen	Probabilidade ¹
Controle	0,38	
Ésteres de ácidos graxos de grau técnico + hidroquinona de butila terciária	0,82	<001
Ésteres de ácidos graxos de grau de reagente + hidroquinona de butila terciária	0,85	<0,0001

¹Probabilidades da Análise da Tabela de Contingência em que a hipótese de zero afirma que as proporções de controle e tratamento são iguais.

Exemplo 5

Estímulo ao Consumo de Dieta com Pólen

Esta experiência foi conduzida entre 1-15 de março de 2004. Doze colônias típicas de apiários da Universidade A&M do Texas foram selecionadas aleatoriamente. As medidas da colônia foram estimadas com o uso de uma grade dividida em seções quadradas de 6,45 cm². A área coberta pelas abelhas foi convertida para o número de abelhas; aproximadamente 1,5 abelhas por cm². (Pankiw e Page 2001; Pankiw e Rubink 2002). A área investigada ocupada com ovos, larvas e pupas, conhecidos como ninhada, foi medida.

Seis colônias foram selecionadas aleatoriamente para receber o tratamento diário de feromônio de ninhada equivalente a três larvas por dia por abelha (1,55 µg/abelha/dia), e seis colônias receberam uma placa de vidro vazia. Sabe-se que uma dose equivalente a três larvas por abelha por dia aumenta a quantidade de busca por pólen em grandes colônias (Pankiew e Page 2001). Cada colônia recebeu um suplemento dietético de pólen disponível comercialmente; 450 g da Brood BuilderTM (Dadant & Sons, Hamilton, Illinois), com o formato de um disco de hambúrguer colocado entre duas folhas tracejadas de papel cera. Novos discos foram fornecidos após o anterior ser consumido. A cada três dias, durante quinze dias, o consumo dos discos das colônias foi inspecionado. Um novo disco era fornecido às colônias que haviam consumido inteiramente o disco anterior. As medições das colônias foram realizadas no 7º e 15º dia. Todas as colônias receberam um novo suplemento de disco com pólen, independentemente da quantidade usada no 7º dia. Os discos anteriores não consumidos foram removidos e pesados para que a quantidade consumida fosse estimada.

A análise da variação foi usada para comparar o feromônio tratado e controlar as colônias. Não foi necessário realizar uma análise de covariação porque, no início da experiência, o número de abelhas e as quantidades de espaço explorado usado pela ninhada, pólen, mel e células vazias, não foi significativamente diferente ($P > 0,05$) entre os grupos de tratamento.

As colônias tratadas com feromônio de ninhada consumiram significativamente mais suplemento de pólen do que as colônias de controle na 1ª e 2ª semana (Tabela 4). A área da ninhada não foi diferente entre os tratamentos na 1ª semana ($F_{1,11}=0,3, P>0,05$). Na 2ª semana, a área da ninhada foi significativamente maior no grupo tratado com feromônio ($F_{1,11}=10,6, P<0,01$; Tabela 2).

Esses resultados indicam que o feromônio estabilizado de ninhada pode ser usado para estimular o consumo de alimentos, resultando em uma maior produção da ninhada que, por sua vez, pode levar a um maior vigor da colônia. O maior consumo de alimentos também pode ser explorado através da incorporação de suplementos dietéticos ou antibióticos em um disco de pólen ou outra fonte de alimento.

Tabela 4. Comparação do consumo de pólen e da área de ninhada entre colônias de abelhas melíferas expostas ao feromônio de ninhada e colônias de controle não expostas.

Tratamento / estatísticas	Consumo (g)		Área da ninhada (cm²)*	
	1ª sem.	2ª sem.	1ª sem.	2ª sem.
Feromônio da ninhada	406,6 ± 9,5	422,5 ± 17,0	3928 ± 586	2975 ± 330
Controle	185,0 ± 21,4	178,3 ± 27,2	3472 ± 668	1800 ± 142
ANOVA $F^{1,11}$	89,7	57,2	0,3	10,7
Probabilidade	0,0001	0,0001	0,6	0,008

Referências

Documentos de Patente nos EUA

Page, R.E. Jr e T. Pankiw, 2002. Synthetic bee pollen foraging pheromone and uses thereof. Pat. EUA No. 2002/0182977 A1.

Outras Publicações

Filmer, R. S. 1932. Brood area and colony size as actors in activity of pollination units. J. Econ. Entomol. 25: 336-343.

Free, J. B. 1967. Factors determining the collection of pollen by honeybee foragers. Anim. Behav. 15:134-144.

Herbert, E. W. 1992. Honey bee nutrition. Pág. 197-233. Em: Graham, J.M. (ed). The hive and the honey bee. Rev. Ed. Dadant & Sons, Hamilton, Illinois.

LeConte, Y. G. Arnold, J. Trouiller e C. Masson, 1990.

10 Identification of a brood pheromone in honeybees. Naturwissenschaften 81: 462-465.

LeConte, Y., A. Mohammedi e G. E. Robinson. 2000. Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. Proc. R. Soc. London B 268: 163-168.

15 Page, R. E., Jr., J. Erber e M.K. Fondrk. 1998. The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). J. Comp. Physiol. A 182: 489-500.

Pankiw, T. 2003. Directional change in a suite of foraging behaviors in tropical and temperate evolved honey bees (*Apis mellifera* L.). Behav. Ecol. Sociobol. 54: 458-464.

Pankiw, T. 2004a. Cued in: honey bee pheromones as information flow and collective decision making. Apidologie 35: 217-226.

25 Pankiw, T. 2004b. Brood pheromone regulates foraging activity of honeybees (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol. 97: 748-751.

Pankiw, T. e R.E. Page, Jr. 1999. The effects of genotype,

age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). J. Comp., Physiol. A 185: 207-213.

5 Pankiw, T. and R.E. Page, Jr. 2000. Response thresholds to sucrose predict foraging division of labor in honey bees. Behav. Ecol. Sociobiol. 47: 265-267.

Pankiw, T. and R.E. Page, Jr. 2001. Brood pheromone modulates sucrose response threshold in honeybees (*Apis mellifera* L.). Behav. Ecol. Sociobiol. 49: 206-0213.

10 Pankiw, T. e R. E. Page, Jr. 2003. Effect of pheromones, hormones and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.). J. Comp. Physiol. A 188:675-684.

Pankiw, T. e W. LO. Rubink. 2002. Pollen foraging response
15 to brood pheromone by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*). Ann.Entomol. Soc. Am. 95: 761-767.

Pankiw, T., R. E. Page, Jr. e M. KI. Fondrk. 1998. Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*). Behav. Ecol. Sociobiol. 44: 193-198.

20 Pankiw, T., C.M. Nelson, R.E. Page, Jr. e M.K. Fondrk. 2004a. The communal crop: Modulation of sucrose response thresholds of pre-foraging honey bees within coming nectar quality. Behav. Ecol. Sociobiol. 55:286-292.

Pankiw, T., R. Roman, R.R. Sagili e K. Zhu-Salzman. 2004b.
25 Pheromone-modulated behavioral suites influence colony growth in the honey bee (*Apis mellifera*). Naturwissenschaften 91: 575-578.

REIVINDICAÇÕES

1. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM
FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS",
caracterizado pelo fato de compreender dois ou mais ácidos
5 carboxílicos de 16-20 carbonos ou de seus ésteres de metila
ou etila, compreendendo a incorporação de uma quantidade
efetiva de um anti-oxidante compatível com o feromônio.

2. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM
FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS",
10 caracterizado pelo fato de compreender dois ou mais de
linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de etila,
palmitato de etila, estearato de etila, linoleato de metila,
linolenato de etila, oleato de etila, palmitato de metila ou
estearato de metila, compreendendo a incorporação de uma
15 quantia efetiva de um anti-oxidante compatível com o
feromônio.

3. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM
FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de
acordo com o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de
20 que o anti-oxidante é um anti-oxidante de grau alimentício.

4. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM
FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de
acordo com o reivindicado em 2, caracterizado pelo fato de
que o anti-oxidante é um composto selecionado a partir do
25 grupo compreendido de hidroxianisol butilado,
hidroxitoluleno butilado, hidroquinona de butila terciária,
ácido cítrico e vitamina E e seus derivados ou qualquer
combinação de dois ou mais de tais anti-oxidantes.

5. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de acordo com o reivindicado em 2, caracterizado pelo fato de que o anti-oxidante inibe a decomposição do linoleato de metila, linolenato de metila, linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de metila e oleato de etila.

6. "COMPOSIÇÃO DE FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", caracterizado pelo fato de compreender: (a) dois ou mais entre: linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de etila, palmitato de etila, estearato de etila, linoleato de metila, linolenato de metila, oleato de metila, palmitato de metila ou estearato de metila e; (b) uma quantidade efetiva de um ou mais anti-oxidantes de grau alimentício selecionados a partir de um grupo compreendendo hidroxianisol butilado, hidroxitoluleno butilado, hidroquinona de butila terciária, ácido cítrico e vitamina E e seus derivados, para administração em abelhas melíferas ou colônias de abelhas melíferas.

7. "COMPOSIÇÃO DE FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de acordo com o reivindicado em 6, caracterizado pelo fato de que as proporções por peso dos componentes em (a) são: (0,1-50%), linolenato de etila (1,3-50%), oleato de etila (0,8-50%), palmitato de etila (0,3-50), estearato de etila (0,7-50%), linoleato de metila (0,2-50%), linolenato de metila (0,2-50%), oleato de metila (0,3-50%), palmitato de metila (0,3-50%) e estearato de metila (1,7-50%).

8. "COMPOSIÇÃO DE FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de acordo com o reivindicado em 7, caracterizado pelo fato de que a quantidade por peso do anti-oxidante em (b) é 0,001 para 50% do peso.

9. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de acordo com o reivindicado em 7, para abelhas melíferas, colônias de abelhas melíferas ou unidades de polinização, caracterizado por compreender incorporar a composição em uma substância inerte selecionada a partir do grupo compreendido de parafina, cera vegetal, cera de abelha, sílica, alumina, celulose, celulose modificada, tecido seco de planta, madeira e um polímero sintético.

10. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de acordo com o reivindicado em 9, caracterizado pelo fato de que a composição é usada para aumentar a proporção das forrageiras de pólen sobre as de não-pólen entre as abelhas operárias melíferas.

11. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de acordo com o reivindicado em 9, caracterizado pelo fato de que a composição é usada para reduzir ou protelar a idade da primeira busca de alimento pelas abelhas operárias melíferas.

12. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de

acordo com o reivindicado em 9, caracterizado pelo fato de que a composição é usada para aumentar o número total de abelhas forrageiras operárias melíferas.

5 13. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de acordo com o reivindicado em 9, caracterizado pelo fato de que a composição é usada para aumentar o peso da carga de pólen levado à colônia por abelhas operárias melíferas forrageiras de pólen.

10 14. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de acordo com o reivindicado em 9, caracterizado pelo fato de que a composição é usada para aumentar o número de grãos de pólen carregados pelos corpos das abelhas operárias
15 melíferas forrageiras de não-pólen.

15 15. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de acordo com o reivindicado em 9, caracterizado pelo fato de que a composição é usada para aumentar a
20 polinização da safra-alvo perto ou dentro da qual as colônias de abelhas melíferas ou as unidades de polinização são colocadas.

25 16. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de acordo com o reivindicado em 9, caracterizado pelo fato de que a composição é usada para estimular o desenvolvimento da glândula alimentícia hipofaríngea da ninhada e a produção de proteína glandular nas abelhas operárias melíferas.

17. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de acordo com o reivindicado em 9, caracterizado pelo fato de que a composição é usada para estimular o consumo da proteína dietética que não os componentes dietéticos e suplementos antibióticos fornecidos por abelhas melíferas.

18. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de acordo com o reivindicado em 9, caracterizado pelo fato de que a administração contínua da composição em uma colônia de abelhas melíferas por um período de pelo menos duas semanas ou mais é usada para aumentar o número de abelhas criadas dentro da colônia.

19. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de acordo com o reivindicado em 9, caracterizado pelo fato de que a administração contínua da composição em uma colônia de abelhas melíferas é usada para inibir a evasão (enxameamento) das abelhas da colônia.

20. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de acordo com o reivindicado em 9, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada em combinação com o feromônio sintético da glândula mandibular da abelha rainha melífera às abelhas melíferas, colônias de abelhas melíferas ou unidades de polinização.

21. "MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", de

acordo com o reivindicado em 20, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada em abelhas melíferas, em colônias de abelhas melíferas ou em unidades de polinização, em combinação com feromônio sintético da glândula mandibular da abelha rainha melífera administrado em plantas fluorescentes em que uma maior polinização é desejada.

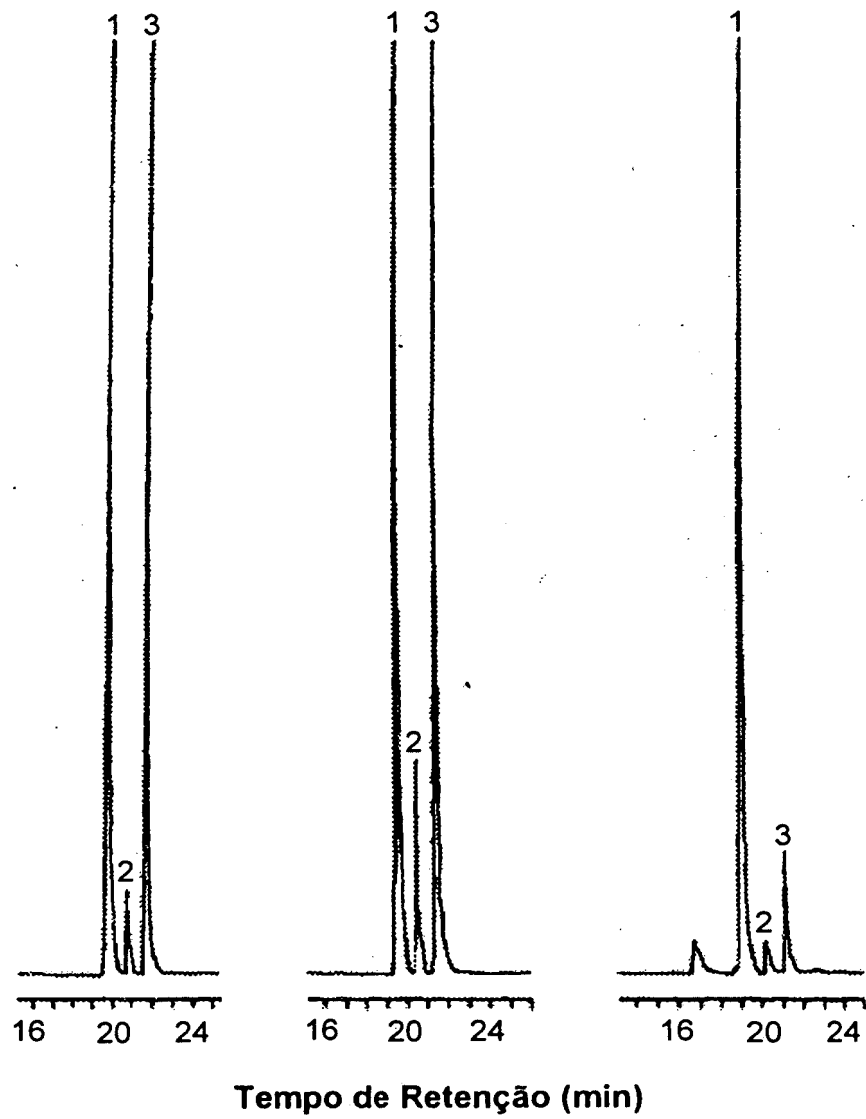


FIG.1

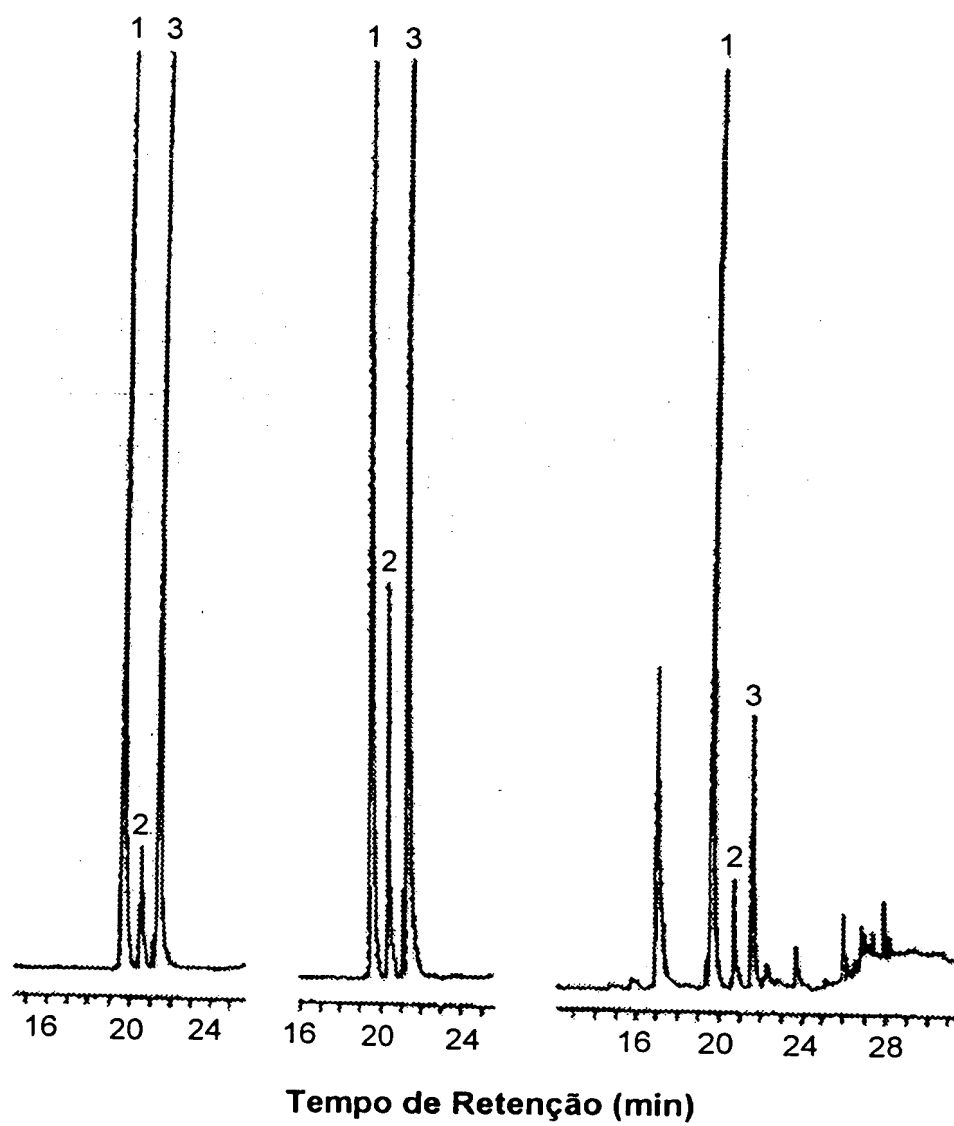


FIG.2

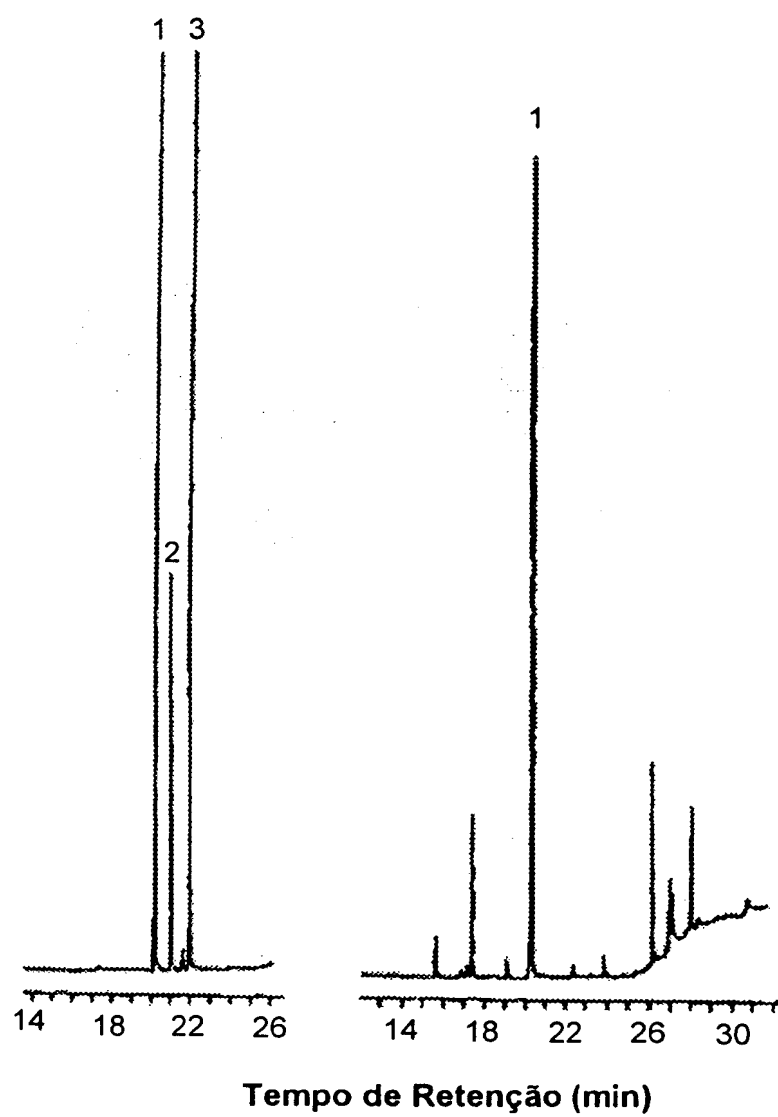
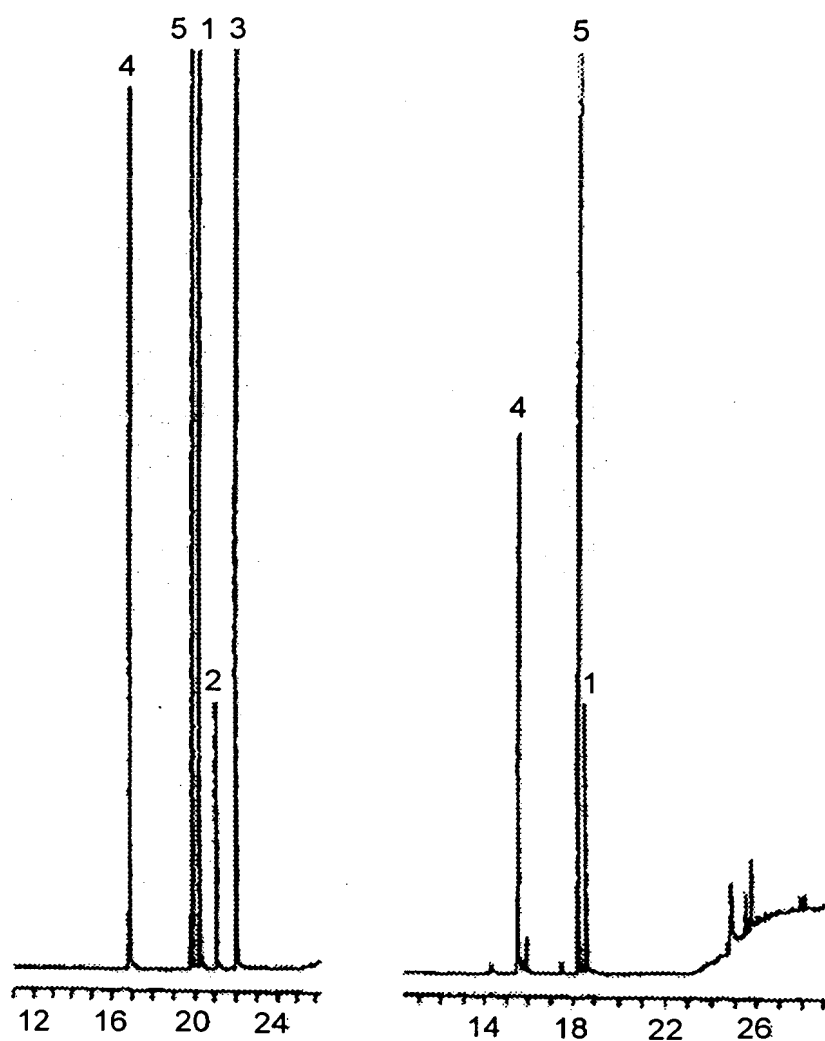


FIG.3



Tempo de Retenção (min)

FIG.4

RESUMO

"MÉTODO DE ESTABILIZAR UM FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS E COMPOSIÇÃO DE FEROMÔNIO SINTÉTICO DE NINHADA DE ABELHAS MELÍFERAS", a invenção se refere a um feromônio sintético estabilizado para a ninhada de abelhas e métodos para estabilizar o feromônio da ninhada de abelhas melíferas, assim possibilitando a produção e o uso sustentado de produtos comerciais baseados nesse feromônio; o feromônio sintético estabilizado pode ser usado para manipular o comportamento e melhorar o desempenho de abelhas operárias melíferas, resultando em um maior vigor da colmeia em geral; a composição do feromônio sintético estabilizado para abelhas melíferas compreende dois ou mais ésteres entre:

linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de etila, palmitato de etila, estereato de etila, linoleato de metila, linolenato de metila, oleato de metila, palmitato de metila e estearato de metila e um anti-oxidante.