

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,  
CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

**Identificação de sexo e castas em abelhas *Apis mellifera* utilizando  
a técnica de Espectroscopia no Infravermelho Próximo**

MAYARA ARANHA BARBOSA

Manaus – AM

Junho/2015

**MAYARA ARANHA BARBOSA**

**Identificação de sexo e castas em abelhas *Apis mellifera* utilizando a técnica de Espectroscopia no Infravermelho Próximo**

ORIENTADORA: Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse

COORIENTADOR: Dr. Jaime Iván Rodríguez Fernández

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

**Manaus- AM**

**Junho/2015**

## **MEMBROS DA BANCA JULGADORA**

1. Prof. Dr. Carlos Gustavo Silva

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

2. Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

3. Prof. Dr. Eliana Feldeberg

Instituto Nacional de Pesquisas de Amazônia - INPA

B238 Barbosa, Mayara Aranha  
Identificação de sexo e castas em abelhas *Apis mellifera* utilizando a técnica de Espectroscopia no Infravermelho Próximo / Mayara Aranha Barbosa. --- Manaus: [s.n.], 2015. 39 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2013.  
Orientador : Gislene Almeida Carvalho-Zilse.  
Coorientador : Jaime Iván Rodríguez Fernánde.  
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

1. *Apis mellifera*. 2. Abelhas. 3. *Apis mellifera*. 4. NIRS I. Título.

CDD 595.799

## SINOPSE

No presente estudo, testamos a eficiência da técnica Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS) na identificação de sexo e de casta, nas diferentes fases ontogenéticas de desenvolvimento da abelha *Apis mellifera*. A análise espectral foi feita em ovo, larva pré-defecante (LPD), larva defecante (LD) e adulto recém emergido. A técnica mostrou-se eficiente para auxiliar na separação de sexo e de castas nas fases de ovo, larva pré-defecante, larva defecante e adulto recém-emergido em abelhas *Apis mellifera*.

### Palavras-chave:

Fases ontogenéticas, Identificação de sexo e casta, *Apis mellifera*, NIRS

## DEDICATÓRIA

**A minha mãe,**

pela confiança e apoio. Um exemplo de vida a ser seguido, mulher guerreira e batalhadora. Sem ela jamais chegaria até aqui!

Obrigada por tudo!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pela força espiritual para a realização desse trabalho.

A minha família, em especial minha mãe **Maria das Graças de Farias Aranha**, pelas renúncias, pelos esforços incessantes e pela dedicação devotada a mim e minha irmã. Sem o amor, carinho e todo o apoio que sempre me deu ao longo dos anos possivelmente eu não estaria aqui.

Agradeço a minha irmã **Lorena Aranha Barbosa** e a minha sobrinha **Beatriz Aranha Guimarães** que, quando a saudade estava “gritando”, falava comigo e só de escutar a voz dessa lindinha meu coração era aliviado.

Agradeço ao meu querido amado namorado **Thulio Mattos de Barros**, que sempre esteve ao meu lado e me apoiou em tudo, quando pensei em desistir foi o primeiro a me fazer ver a realidade e me ajudar a superar os obstáculos. É um verdadeiro amigo e companheiro em todos os momentos que passamos juntos.

A minha orientadora **Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse**, por ser uma excelente pessoa e profissional, a quem sou imensamente grata por acreditar em mim, confiando-me o projeto e me acolheu em um momento difícil, me acompanhou e me orientou na elaboração deste trabalho sempre com muito boa vontade e disponibilidade.

A **Dra. Eliana Feldeberg**, por ter me aconselhado bastante e me apoiado em um momento de dificuldade, onde pensei em desistir do sonho do mestrado. Me ajudou bastante e me deu forças para continuar.

Ao **Dr. Jaime Iván Rodríguez Fernández**, pela co-orientação e confiança para desenvolver esse projeto.

A MSc. **Flávia Durgante** e **Dr. Alberto Vicentini** pelo apoio e ensinamentos. Ajudaram-me bastante na parte estatística do trabalho. Acredito que sem esse apoio não teria como desenvolver o projeto.

A todos os abelhudos, **Diana, André, Luciana, Aline, Tatiane, Livia, Filipe, Diego e Hélio** por terem me ajudado diretamente ou indiretamente no desenvolvimento desse trabalho e, principalmente, pela amizade. Ao abelhudo **Hélio** por ter me ajudado nas minhas coletas de

*Apis mellifera*, e que nessas coletas levou muitas picadas, e mesmo assim, sempre teve um sorriso no rosto e sempre me ajudou em tudo. Muitas vezes pediu para eu sair do local da coleta para me proteger e com isso levava mais e mais picadas. Obrigada mesmo.

De seguida não posso deixar passar em claro todos os meus amigos de mestrado **Vanessa Pinheiro, Elciomar, Fabrício, Erico, Sandra** e em especial três pessoas dessa turma que se destacaram pela amizade e companheirismo que são **Vanessa Sales, Erika e Patrik**: a todos obrigada por todas as experiências trocadas.

Aos **Professores do PPG GCBEv** pelos ensinamentos nas disciplinas do mestrado.

Ao **INPA** – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, a **CAPES e FAPEAM** pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que me ajudaram de forma direta e indireta na concretização deste trabalho o meu muito obrigado.

A todos vocês, que amo imensamente, a minha gratidão e o meu reconhecimento, pois nos méritos desta conquista há muito de vossas presenças.

## RESUMO

A diferenciação de sexo e casta está sendo compreendida em algumas espécies de abelhas. Nas abelhas do gênero *Apis*, o sexo é determinado por uma cascata de genes, entre eles o *csd* e o *fem*. Já a diferenciação de casta depende da quantidade e da qualidade da dieta que a larva está recebendo. As larvas que recebem uma maior quantidade e melhor qualidade dos alimentos - geléia real - durante todo o seu desenvolvimento dará origem à rainha, enquanto que as larvas que se alimentam em menor quantidade e com alimento menos nutritivo resulta em operárias. Apesar desses mecanismos genéticos e ambientais da diferenciação de sexo e casta já serem bem conhecidos em *Apis mellifera*, ainda é de grande importância a possibilidade do uso de técnicas avançadas, que permitam essa identificação e diferenciação dos indivíduos, em qualquer estágio do seu desenvolvimento e independente de se ter acesso à informação sobre a célula de cria de sua origem, para estudos que dependem dessa identificação prévia. Nesse sentido, objetivou-se avaliar o potencial da técnica NIRS (Espectroscopia de Infravermelho Próximo) para reconhecer sexos e castas em diferentes fases do desenvolvimento de *Apis mellifera*. Foram coletados machos, operárias e rainhas em diferentes fases de desenvolvimento (ovo, larva pré-defecante, larva defecante e adulto recém emergido) e espectros no infravermelho próximo de cada amostra foram registrados, para posterior análise de relação sexo e casta. Com a análise de componente principal (PCA) notou-se que a ordenação dos indivíduos, com base em duas dimensões – dorsal e lateral, captou 98,29% da variação para os espectros brutos, separando as fases. Demonstrou-se, por meio da validação cruzada, que a probabilidade de se identificar corretamente um indivíduo, com base nos dados espectrais, foi superior a 96%. As análises discriminantes indicaram uma alta acuracidade dos dados espectrais para a identificação de sexo e casta, independente da posição (dorsal e lateral). Sendo assim, a espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) apresentou excelente desempenho, destacando-se como uma ferramenta promissora para distinguir sexo e casta em abelhas *Apis mellifera*.



## ABSTRACT

The sex and caste differentiation has been understood for some species of bees. In bees of the genus *Apis*, sex is determined by a cascade of genes including the *csd* and *fem*. Already the caste differentiation depends on the amount and quality of nutrition that the larva will receive. The larvae that receive a larger amount and quality of food - royal jelly - throughout its development will lead to the queen, while the larvae that feed fewer and less nutritious food results in workers. Despite these genetic and environmental mechanisms of sex and caste differentiation are well known in *Apis mellifera*, it is very important the possibility of using advanced techniques that allow the identification and differentiation of individuals at any stage of their development and independent to have information about its cell creates for studies that need on that prior identification. In this sense, the objective of this study was to evaluate the potential of Near-infrared spectroscopy (NIRS) to recognize sexes and castes in different stages of development of *Apis mellifera*. Were collected males, workers and queens in different stages of development (egg, pre-defecating larvae, defecating larvae and adult newly emerged) and near infrared spectra of each samples were collected for later relationship analysis with gender and caste. In the principal component analysis (PCA) reveals that the order of subjects based on two dimensions - the dorsal and lateral, captured 98.29 % of the gross spectral variation for separating the phases. It has been shown by cross-validation, the probability of correctly identifying an individual based on the spectral data was higher than 96 %. The discriminant analyzes indicated a high accuracy of the spectral data to identify sex and caste independently of position (dorsal and lateral). Therefore the Near-infrared spectroscopy (FT- NIRS) showed excellent performance, standing out as a promising tool to distinguish gender and caste in *Apis mellifera* bees.

## Sumário

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
Sumário .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE ABREVIações E SIGLAS .....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Abelhas .....	1
1.2. Biologia do Desenvolvimento .....	3
1.3. Diferenciação de Sexo e Castas .....	4
1.4. Espectroscopia no Infravermelho Próximo .....	6
2. OBJETIVOS .....	9
2.1. Objetivo Geral .....	9
2.2. Objetivos Específicos .....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
3.1. Material Biológico .....	10
3.2. Obtenção das Abelhas .....	10
3.3. Etapas Experimentais .....	10
3.4. Coleta Espectral .....	12
3.5. Análise Estatística .....	13
4. RESULTADOS .....	15
4.1. Padrões espectrais de indivíduos de <i>Apis mellifera</i> .....	15
4.2. Análise de Componentes Principais (PCA) .....	18
4.3. Análise Discriminante Linear – Dados Modelo vs Dados Teste .....	23
4.4. Análise Discriminante Linear – “Leave One Out” .....	24
5. DISCUSSÃO .....	29
6. CONCLUSÃO .....	32
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Número de amostras em diferentes fases do desenvolvimento de abelhas <i>Apis mellifera</i> , utilizadas no estudo para cada sexo/casta.....	11
<b>Tabela 2:</b> Quantidade de espectros capturados por sexo/casta e posição. ....	11
<b>Tabela 3:</b> Média das probabilidades de identificação correta (acertos) na Análise Discriminante Linear - Modelo <i>vs</i> Teste com 100 randomizações.....	24
<b>Tabela 4:</b> Média das probabilidades de identificação correta (acertos) na Análise Discriminantes Linear – Leave one out com 100 randomizações. ....	24
<b>Tabela 5:</b> Predições incorretas para ovo na Análise Discriminantes Linear – “Leave one out” com 100 randomizações.....	25
<b>Tabela 6:</b> Predições incorretas para larva LPD na Análise Discriminantes Linear – “Leave one out” com 100 randomizações.....	26
<b>Tabela 7:</b> Predições incorretas para Adultos recém-emergidos na Análise Discriminante Linear – Leave one out com 100 randomizações. ....	26

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição geográfica da espécie *Apis mellifera*. Fonte: <http://www.discoverlife.org>..... 2
- Figura 2:** Desenvolvimento da abelha *Apis mellifera*. Os números indicam dias após a postura dos ovos: ovos (dias 1 a 3); larva (dias 5, 7 e 9); pré-pupa (dia 10); pupa (dias 11 a 14); adulto (dia 15). Fonte: Nunes-Silva *et al.* (2006)..... 3
- Figura 3:** Esquema representando o desenvolvimento larval em *Apis mellifera*. Fonte: [jesseproject.weebly.com](http://jesseproject.weebly.com)..... 4
- Figura 4:** Região do infravermelho no espectro electromagnético. Fonte: Feist *et al.* 2002. ... 7
- Figura 5:** Espécie *Apis mellifera* proposta para o estudo. A - Colmeia de *Apis mellifera*. B – Operária forrageando. Fonte: Acervo GPA..... 10
- Figura 6:** Espectroscopia no Infravermelho Próximo. A - Aparelho *Antaris II FT-NIR Analyzer* no qual foram realizadas as leituras espectrais. B - Ferramenta auxiliar “Diafragma” para posicionamento da amostra no Aparelho *Antaris II FT-NIR Analyzer*. ..... 12
- Figura 7:** Padrões dos espectros de amostras nas diferentes fases de desenvolvimento obtidas no NIRS. Tracejado Vermelho Fino – Adulto (AD); Tracejado Azul Médio – Larva defecante (LD); Linha Contínua Verde – Larva pré-defecante (LPD); Tracejado Preto Grosso – Ovo. . 15
- Figura 8:** Padrões do espectro de ovo de amostras de *Apis mellifera* resultantes das leituras espectrais obtidas no FT-NIRS. A–Espectro de Ovo de Macho (MC); B–Espectro de Ovo de Fêmea (FM). ..... 16
- Figura 9:** Padrões individuais de amostras de macho (MC) de *Apis mellifera* resultantes das leituras espectrais obtidas no FT-NIRS. A–Espectro de Macho na fase de Larva Pré-Defecante (LPD); B– Espectro de Macho na fase de Larva Defecante (LD); C– Espectro de Macho na fase de Adulto (AD). ..... 16
- Figura 10:** Padrões individuais de amostras de operárias (OP) de *Apis mellifera* resultantes das leituras espectrais obtidas no FT-NIRS. A–Espectro de Operária na fase de Larva Pré-

Defecante (LPD); B– Espectro de Operária na fase de Larva Defecante (LD); C– Espectro de Operária na fase de Adulto (AD)..... 17

**Figura 11:** Padrões individuais de amostras de rainha (RA) de *Apis mellifera* resultantes das leituras espectrais obtidas no FT-NIRS. A–Espectro de Rainha na fase de Larva Pré-Defecante (LPD)..... 17

**Figura 12:** Análise de Componentes Principais (PCA) em duas dimensões explicando 98,29% da variação espectral por NIRS de diferentes fases em *Apis mellifera*. X Azul – Ovo; Circulo Preto – Adulto; Cruz Verde – Larva pré- defecante (LPD); Triangulo Vermelho – Larva Defecante (LD); ..... 18

**Figura 13:** Análise de Componentes Principais (PCA) em duas dimensões explicando 99,88% a similaridade espectral do sexo dos ovos de *Apis mellifera*. Circulo Preto – Fêmea; Triangulo Vermelho – Macho. As flechas indicam as duas amostras de macho que se misturaram no espaço com as fêmeas. .... 19

**Figura 14:** Análise de Componentes Principais (PCA) em larvas Larvas Pré-Defecantes (LPD) considerando as posições Dorsal (DS) + Lateral (LT)..... 20

**Figura 15:** Análise de Componentes Principais (PCA) em larvas Larvas Defecantes (LD) considerando as posições Dorsal (DS) + Lateral (LT)..... 20

**Figura 16:** Análise de Componentes Principais (PCA) em Adultos recém-emergidos (AD) considerando as posições Dorsal (DS) + Lateral (LT)..... 21

**Figura 17:** Análise de Componentes Principais (PCA) em duas dimensões explorando separadamente as duas posições (Lateral e Dorsal) em que as leituras espectrais foram feitas na fase de desenvolvimento Larva Pré-Defecante (LPD) para indivíduos de *Apis mellifera*. . 22

**Figura 18:** Análise de Componentes Principais (PCA) em duas dimensões explorando separadamente as duas posições (Lateral e Dorsal) em que as leituras espectrais foram feitas na fase de desenvolvimento Larva Defecante (LD) para indivíduos de *Apis mellifera*..... 23

**Figura 19:** Análise de Componentes Principais (PCA) em duas dimensões explorando separadamente as duas posições (Lateral e Dorsal) em que as leituras espectrais foram feitas na fase de desenvolvimento Adulto recém-emergido para indivíduos de *Apis mellifera*. ..... 23

- Figura 20:** Histograma de Análise Discriminante Linear (LDA) na fase de larva pré-defecante de *Apis mellifera* com média em torno de 98,5%. ..... 25
- Figura 21:** Histograma de Análise Discriminante Linear (LDA) na fase de Adulto recém-emergido e na posição Dorsal em *Apis mellifera* com média em torno de 98%. (Média em Vermelho e Mediana em Azul)..... 27
- Figura 22:** Histograma de Análise Discriminante Linear (LDA) na fase de Adulto recém-emergido e na posição Lateral em *Apis mellifera* com média em torno de 98%. (Média em Vermelho e Mediana em Azul)..... 28

## **LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS**

**CSD** – *Complementary Sex Determiner* gene

*fem* – *feminizer* gene

**NIRS** – Espectroscopia no Infravermelho Próximo

**IR** – Radiação Infravermelho

**LPD** – Larva Pr-defecante

**LD** – Larva Defecante

**HO** – Horizontal

**DS** - Dorsal

**LT** – Lateral

**PCA** – Análise de Componentes Principais

**LDA** – Análise Discriminante Linear

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1. Abelhas

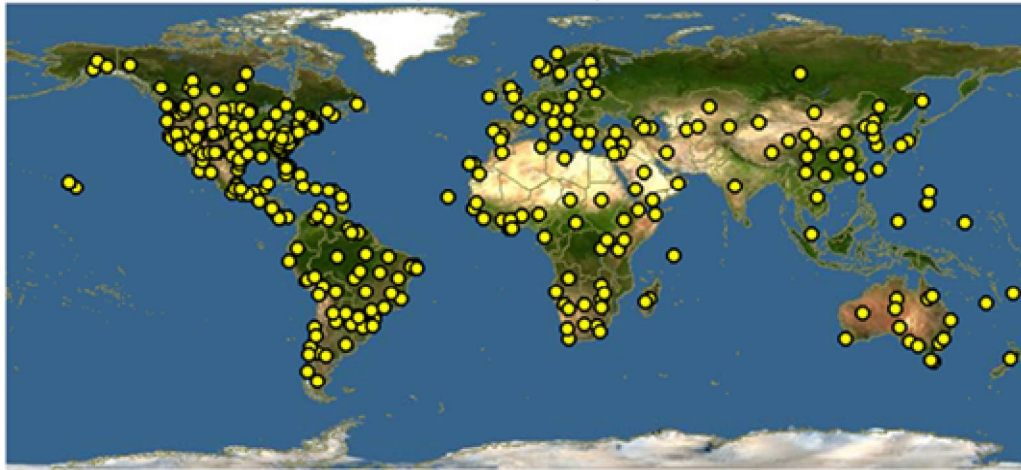
As abelhas são insetos da ordem Hymenoptera (composta também por formigas e vespas), família Apidae com mais de 16.000 espécies, a qual é dividida em sete subfamílias (Stenotritinae, Colletinae, Melittinae, Halictinae, Andreninae, Megachilinae e Apinae), onde cinco delas estão presentes no Brasil (Rafael *et al.* 2012). Dentro da subfamília Apinae, destaca-se a tribo Apini, constituída apenas pelo gênero *Apis*. Dentro desse gênero destaca-se a espécie *Apis mellifera* que é considerada a espécie modelo para as abelhas (Camargo e Pedro 2013).

As abelhas possuem grande importância ecológica, pois têm como característica o hábito de se alimentar de pólen, sendo consideradas cruciais para a manutenção do ecossistema global, uma vez que são os polinizadores mais significantes e especializados (Grimaldi e Engel 2005; Michener 2007).

As abelhas ocorrem em todos os ecossistemas terrestres, com exceção da Antártida, do pólo Norte e de áreas próximas a essas regiões (Michener 2007). A espécie *Apis mellifera* também chamada, nas Américas, de “abelha africanizada” possui ampla distribuição geográfica (Figura 1) (Kerr 1992). A alta capacidade de defesa, de adaptação a ambientes inóspitos e a capacidade de reprodução, com ciclo de vida mais curto que as demais subespécies existentes, são características que permitem à abelha africanizada uma rápida ampliação da biomassa e significativo aumento populacional (Gonçalves 1994). A conjunção de todos esses fatores contribuiu para que as abelhas africanizadas atualmente ocupem quase todo continente americano (Gonçalves 2001; Krebs 2001).

No Brasil, estão bem adaptadas a áreas urbanas, bordas de florestas e formações vegetativas abertas (Oliveira e Cunha 2005). Na Amazônia, a despeito da exuberância e da grande extensão territorial da floresta, as abelhas africanizadas dificilmente são vistas ou coletadas no interior de florestas densas (Oliveira e Cunha 2005; Silva 2005).





**Figura 1:** Distribuição geográfica da espécie *Apis mellifera*. **Fonte:** <http://www.discoverlife.org>

Estima-se que 15% das abelhas são parasitas de ninhos de outras abelhas, 80% possuem hábito solitário, e apenas 5% das espécies de abelhas são sociais (Michener 1974). Podemos encontrar graus diferentes de organização social para a subfamília Apinae (Michener 2000). As abelhas são consideradas eussociais, quando suas colônias apresentam cuidado cooperativo da prole, sobreposição de duas ou mais gerações, onde os membros adultos cuidam cooperativamente dos jovens e apresentam divisão de trabalho e casta reprodutora e não-reprodutora (Wilson e Hölldobler 2005).

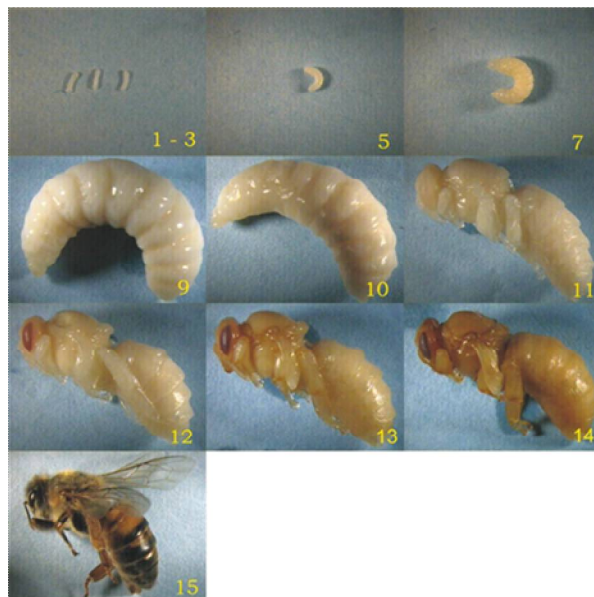
As colônias/colmeias de abelhas são formadas por indivíduos fêmeas e machos que se organizam em funções específicas para o bom desenvolvimento dessa sociedade. Em cada colmeia existem cerca de 60 mil abelhas e cada colônia é constituída por uma única rainha, dezenas de zangões e milhares de operárias (Seeley 1982).

A rainha é a fêmea fértil da colônia, responsável pela postura dos ovos após ser fecundada pelo macho. A abelha operária é responsável por todo o trabalho realizado no interior da colmeia, ou seja, encarregam-se da higiene da mesma, garantem o alimento e a água de que a colônia necessita, coletando pólen e néctar, produzem a cera, com a qual constroem os favos, alimentam a rainha, os zangões e as larvas por nascer e cuidam da defesa de toda colônia. Os machos permanecem dentro da colônia até atingirem a idade adulta. Após fecundar a rainha, o macho morre em poucas horas, pois perde parte do seu aparelho reprodutor e abdome (Ramos e Carvalho 2007).

## 1.2. Biologia do Desenvolvimento

O desenvolvimento biológico das abelhas da espécie modelo *Apis mellifera* é do tipo holometábolo, onde o indivíduo passa pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto (Nunes-Silva *et al.* 2006).

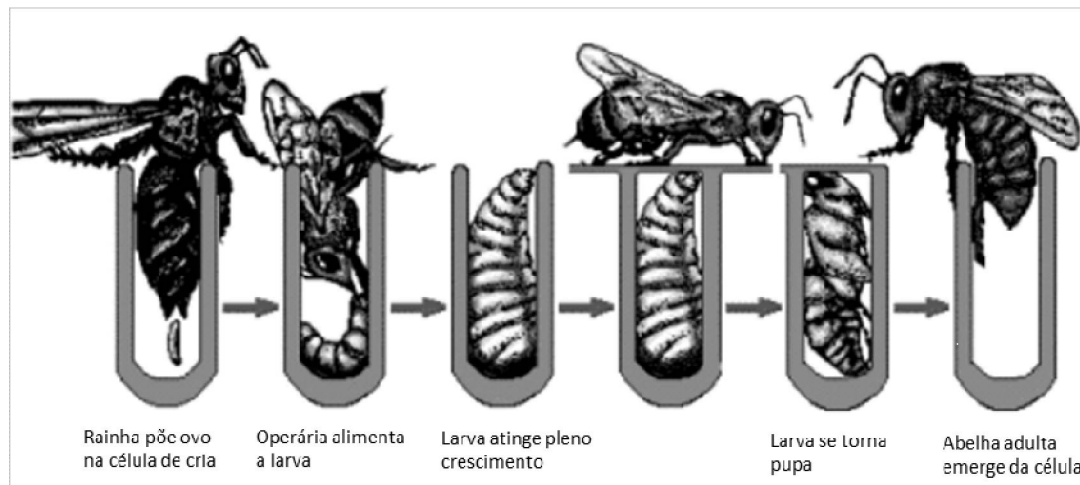
O ovo eclode em cerca de 3 dias após a postura e entra no estágio larval (Figura 2) que consiste basicamente em um período de alimentação e crescimento (Nunes-Silva *et al.* 2006).



**Figura 2:** Desenvolvimento da abelha *Apis mellifera*. Os números indicam dias após a postura dos ovos: ovos (dias 1 a 3); larva (dias 5, 7 e 9); pré-pupa (dia 10); pupa (dias 11 a 14); adulto (dia 15).

**Fonte:** Nunes-Silva *et al.* (2006).

Nas abelhas *Apis*, as larvas são alimentadas até o 8º dia, após esse processo de alimentação essas larvas são chamadas de larva pré-defecantes (LPD). Logo que inicia a defecação a larva é denominada defecante (LD). A transição larva-pupa consiste em um período de complexa reorganização e formação de tecidos e estruturas dos adultos (Snodgrass 1956). A partir do 9º dia, as abelhas adultas operculam a célula de cria onde se encontra a LD e a partir daí a abelha não mais se alimenta. Elas continuam seu desenvolvimento passando pelo estágio de pupa até aproximadamente o 15º dia, quando então emerge o indivíduo adulto (Figura 3) (Nunes-Silva *et al.* 2006).



**Figura 3:** Esquema representando o desenvolvimento larval em *Apis mellifera*. **Fonte:** jesseproject.weebly.com

Para seu completo desenvolvimento as larvas de *Apis mellifera* são alimentadas diretamente pelas operárias (as células de cria ficam abertas e em contato direto com qualquer membro da colônia) (Nunes-Silva *et al.* 2006), diferente de outras espécies eussociais, como é o caso das abelhas da tribo Meliponini cujas operárias constroem as células e depositam o alimento em aproximadamente 3/4 do seu volume e a rainha, logo após, realiza a postura (Carvalho-Zilse e Nunes-Silva 2012). Assim, em Meliponini, as operárias fecham as células encerrando o contato ovo-adulto até o nascimento do indivíduo.

### 1.3. Diferenciação de Sexo e Castas

Em abelhas não há cromossomo sexual diferenciado. O sexo é determinado ainda nas primeiras horas embrionárias (Kerr *et al.* 1996) por haplodiploidia, onde os machos se originam de ovos não fertilizados (haplóides) e as fêmeas, de ovos fertilizados (diplóides) (Carvalho 2001). Entretanto, também existe um mecanismo complementar de determinação sexual baseado em um único loco, denominado CSD (*Complementary Sex Determiner gene*), segundo o qual, os indivíduos heterozigotos são fêmeas e os indivíduos hemi ou homozigotos são machos. Entretanto, os machos diplóides não são viáveis reprodutivamente e são mortos pelas operárias (Carvalho 2001). O gene responsável por este mecanismo de determinação de sexo, denominado *csd* foi isolado e caracterizado em *Apis mellifera* por Beye *et al.* (2003).

Mais tarde, Hasselmann *et al.* (2008) encontraram um outro gene relacionado à determinação de sexo em *A. mellifera*, denominado *fem* (*feminizer Gene*), sobre o qual o *csd* atua na cascata da regulação de determinação sexual.

O gene *csd*, que consiste no sinal primário responsável pela determinação de sexo em *Apis*, não foi encontrado em outras espécies de abelhas. Evidências filogenéticas sugerem que o *csd* tenha surgido por duplicação gênica dentro da linhagem Apini depois que esta divergiu de Bombini e Meliponini. Assim, o gene *csd* pode não ser a base molecular universal da determinação complementar de sexo, sugerindo que outros sinais moleculares desconhecidos possam ser determinadores primários do sexo em outras espécies de abelhas. No entanto, o gene *fem* já foi descrito também em *Melipona interrupta*, na qual foi presumido que o gene *fem* também esteja associado à determinação de sexo (Hasselmann *et al.* 2008).

Depois que o sexo foi determinado, as abelhas fêmeas são diferenciadas em castas reprodutivas (rainhas) e não-reprodutivas (operárias) (Barchuk *et al.* 2007). Segundo Grimaldi e Engel (2005), as castas reprodutivas e não reprodutivas nos insetos em geral possuem notáveis diferenças na sua morfologia, fisiologia e comportamento. Em Apini, a diferenciação de castas inicia-se no último estágio larval, entretanto, os mecanismos subjacentes a essa diferenciação são distintos dentro das diferentes tribos da família Apidae. Sabe-se que a diferenciação de castas é determinada pela quantidade e qualidade de alimento recebido pelas larvas (Barchuk *et al.* 2007).

Em *A. mellifera*, a produção de rainhas e operárias depende da quantidade e da qualidade da dieta que a larva recebe. Os favos, na colmeia, são constituídos por células de cria de tamanhos diferentes, que orientam a rainha à postura de ovos fertilizados ou não fertilizados e indicam também as operárias o tipo de cuidado que deve ser dado ao seu ocupante. As células maiores, conhecidas como realeiras, recebem uma maior quantidade e melhor qualidade do alimento - geléia real (alimento com alto teor de nutrientes) durante todo o seu desenvolvimento e dará origem à rainha (Gullan e Cranston 2007; Carvalho-Zilse e Nunes-Silva 2012). As larvas de células de cria menores recebem alimento altamente nutritivo, conhecido como geléia real, até iniciarem o seu último ínstar larval, quando ocorre a substituição por um alimento menos nutritivo e em menor quantidade, resultando em operárias (Barchuk *et al.* 2007). Os machos nascem de células de tamanho intermediário e recebem o mesmo tipo de alimentação das operárias.

Apesar dos mecanismos genéticos e ambientais de diferenciação de sexo e castas já serem conhecidos em *Apis mellifera*, a possibilidade do uso de técnicas alternativas, que permitam essa identificação e diferenciação dos indivíduos em qualquer estágio do seu desenvolvimento, independente de se ter a informação sobre a célula de origem do indivíduo, é promissor para seu uso em análises genéticas moleculares, estudos de expressão gênica,

dentre outros, que necessite da identificação prévia e da preservação da amostra viva. Tais estudos com *Apis mellifera* poderão servir de modelo para outros gêneros de Apini, como é o caso de *Melipona*, em que todas as células possuem o mesmo tamanho e recebem o mesmo tipo de alimentação.

Nesse sentido, uma técnica que vem auxiliando diversos estudos, que dependem da discriminação prévia de indivíduos, com preservação das amostras, é a Espectroscopia no Infravermelho Próximo.

#### **1.4. Espectroscopia no Infravermelho Próximo**

O termo espectroscopia designa métodos analíticos, em que se estuda a interação de radiações eletromagnéticas com as moléculas. A ligação de dois átomos em moléculas envolve diferentes tipos de energia, tais como energia translacional, vibracional e eletrônica. No caso da Espectroscopia no infravermelho, esta tem por base os movimentos relativos dos átomos numa molécula, isto é, as suas vibrações (Alcácer 2007).

A descoberta da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS – Near infrared spectroscopy) é atribuída a Herschel em 1800 quando investigava qual cor da radiação solar produzia mais calor, utilizando para isso um prisma de vidro, transparente à radiação, que decompunha a luz solar (Naes *et al.* 2002).

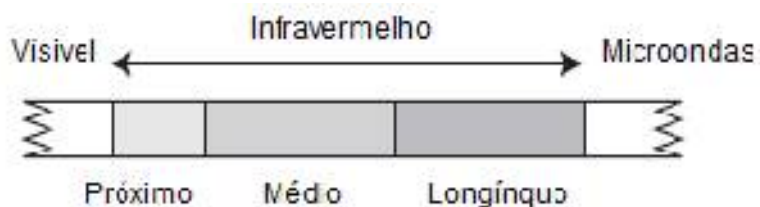
O NIRS tem como objetivo geral investigar uma amostra, a fim de adquirir informação qualitativa e quantitativa proveniente da interação das ondas eletromagnéticas do infravermelho próximo com seus constituintes químicos (Pasquini 2003).

A NIRS é uma técnica não destrutiva, rápida e que não necessita de tratamento prévio das amostras (Fernández 2008), além de aprimorar as análises convencionais. A técnica realiza análise em qualquer molécula que apresente, principalmente, ligações de C-H, O-H, N-H, S-H e C=O, com alta precisão (Pasquini 2003). Esta técnica está relacionada com a natureza das ligações moleculares, que por sua vez são definidas pelas ligações entre os átomos ou grupo de átomos, que formam a amostra. Essas informações podem ser expressas de diferentes formas na espectroscopia. Quando uma amostra de material orgânico é irradiada, as ligações químicas vibram continuamente, provocando um alongamento e flexão das moléculas o que provoca um tipo de movimento de onda característico do grupo funcional que a compõe (Foley *et al.* 1998).

A NIRS é uma técnica analítica, que consiste basicamente em incidir sobre um material biológico, seja ele um pedaço de madeira, uma folha seca ou até mesmo um inseto, um raio de luz em comprimento de onda na região do infravermelho, medindo-se depois a quantidade de luz absorvida pelo material. Esta técnica produz um espectro, ou seja, um conjunto de valores de absorbância, em diferentes números de onda da região espectral utilizada. Os valores de absorbância refletem as características químicas e estruturais do material (Stuart 2004).

A técnica da NIRS combinada com ferramentas quimiométricas através da medida de refletância difusa de insetos intactos mostra-se uma alternativa promissora para estudos biológicos relacionados a determinação de espécies, identificação de padrões evolutivos e detecção de variabilidade geográfica em eucariontes (Rodríguez-Fernández *et al.* 2011).

No espectro eletromagnético, a região do infravermelho encontra-se entre as gamas do visível e as microondas (Figura 4), e subdivide-se em infravermelho próximo (4000 – 12500  $\text{cm}^{-1}$ ), médio (400 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) e longínquo (10 – 400  $\text{cm}^{-1}$ ) (Siesler *et al.* 2002).



**Figura 4:** Região do infravermelho no espectro electromagnético. **Fonte:** Feist *et al.* 2002.

Pelo seu potencial, esta técnica vem tornando-se uma ferramenta bastante utilizada industrialmente (Siesler *et al.* 2002), em diferentes áreas tais como agricultura, alimentos, indústria farmacêutica, etc (Saboya *et al.* 2002). No Brasil, as primeiras contribuições para a aplicação de espectroscopia NIRS foram em 1991, por Nishiyama (Paquini 2003).

Durgante *et al.* (2013) exploraram registros espectrais obtidos a partir de folhas das espécies dos gêneros *Eschweilera* e *Corythophora* para avaliar se os dados revelam informações filogenéticas, com base na correlação entre distâncias filogenéticas e espectrais. Estes autores verificaram que a técnica é bastante promissora para auxiliar na identificação de espécies florestais da Amazônia, uma vez que apresentou uma média de 99,4% de acerto na discriminação entre grupos geneticamente distintos, mesmo trabalhando com espécies próximas, evolutivamente.

Já, Rodríguez-Fernández *et al.* (2011) utilizaram a técnica de NIRS para propor, testar e organizar hipóteses simultâneas de delimitação de espécies em moscas (Diptera), testando a utilização da mesma como um método rápido e não destrutivo na delimitação de espécies. Como resultado, concluíram que, usando a espectroscopia NIRS foi possível identificar corretamente nove espécies de moscas, o que sugeriu uma forma de impressão digital molecular para cada espécie. Assim, Rodríguez-Fernández *et al.* (2011) afirmam que a espectroscopia NIR permite a quantificação do fenótipo molecular, que é feita a partir dos modos de vibração de todas as moléculas presentes na amostra.

A técnica NIRS também já foi utilizada na determinação e identificação de sexo de mosca (na fase de pupa) (Dowell 2005) e na determinação de espécies e castas de formigas do gênero *Ectatomma* conforme registrado por Newey *et al.* (2008).

Diante disso, este estudo utilizou a técnica NIRS com a intenção de contribuir para a identificação e diferenciação de sexo e de castas em diversas fases ontogenética de *Apis mellifera* visando potencializar seu uso em trabalhos futuros, em diferentes espécies de abelhas.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial da técnica NIRS (Espectroscopia no Infravermelho Próximo) para reconhecer sexos e castas em diferentes fases do desenvolvimento de *Apis mellifera*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Testar a utilização da espectroscopia no infravermelho próximo para verificar sua acuracidade em identificar e diferenciar indivíduos em diferentes fases (Ovo, Larva pré-defecante, Larva defecante e Adulto recém emergido) de desenvolvimento em *Apis mellifera*;
- Avaliar qual fase de desenvolvimento é a melhor para fazer o reconhecimento de sexo e casta para *Apis mellifera*;
- Investigar se há influência da posição do indivíduo (dorsal ou lateral) durante a captura do espectro para distinguir sexo/casta dos indivíduos de *Apis mellifera*.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 3.1. Material Biológico

O presente estudo utilizou como material biológico abelhas da espécie *Apis mellifera*, conhecida como abelha-europeia ou africanizada (Figura 5).



**Figura 5:** Espécie *Apis mellifera* proposta para o estudo. **A** - Colmeia de *Apis mellifera*. **B** – Operária forrageando. **Fonte:** Acervo GPA.

#### 3.2. Obtenção das Abelhas

As amostras de abelhas da espécie *Apis mellifera*, em diferentes fases do desenvolvimento, foram obtidas de uma colmeia no Apiário do Sítio Jesus da Divina Misericórdia, Iranduba – AM ( $3^{\circ}12'39.79''S$  /  $60^{\circ}07'36.36''O$ ).

#### 3.3. Etapas Experimentais

Foram coletados favos de *Apis mellifera* contendo ovos, larvas nos estágios de pré-defecante (LPD), defecante (LD) e adultos recém-emergidos de todos os tipos de indivíduos presentes na colmeia (Rainha, Operária e Macho). Os indivíduos foram retirados dos favos com ajuda de pinças entomológicas e colocadas em micro tubos que foram mantidos em ultra freezer à  $-80^{\circ}C$ .

Os indivíduos foram amostrados de acordo com o sexo, a casta e a fase do desenvolvimento, conforme descritos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Número de amostras em diferentes fases do desenvolvimento de abelhas *Apis mellifera*, utilizadas no estudo para cada sexo/casta.

Sexo	Casta	Fases de Desenvolvimento				Total
		Ovo	LPD	LD	Adulto	
Macho		13	50	50	50	163
Fêmeas	Operária	30	50	34	50	164
	Rainha		3	-	1	4
<b>Total</b>		43	103	84	101	331

Legenda: LPD – Larva pré-defecante; LD – Larva defecante.

Espectros no infravermelho próximo de cada amostra foram coletados para posterior análise de relação sexo e casta, uma vez que é possível identificá-los, com base no tamanho da célula de cria. As leituras para ovos foram feitas na posição horizontal enquanto que para larvas LPD, LD e adultos recém emergidos foram feitas duas leituras para cada indivíduo, sendo a primeira leitura na parte dorsal e a segunda na parte lateral direita como pode ser visto na tabela 2.

**Tabela 2:** Quantidade de espectros capturados por sexo/casta e posição.

Sexo/Casta	Posição	LPD	LD	Adulto	Total
Macho	Dorsal	50	50	50	150
	Lateral	50	50	50	150
Operária	Dorsal	50	34	50	134
	Lateral	50	34	50	134
Rainha	Dorsal	3	-	1	4
	Lateral	3	-	1	4
Total de espectros		206	168	202	576

Legenda: LPD – Larva pré-defecante; LD – Larva defecante

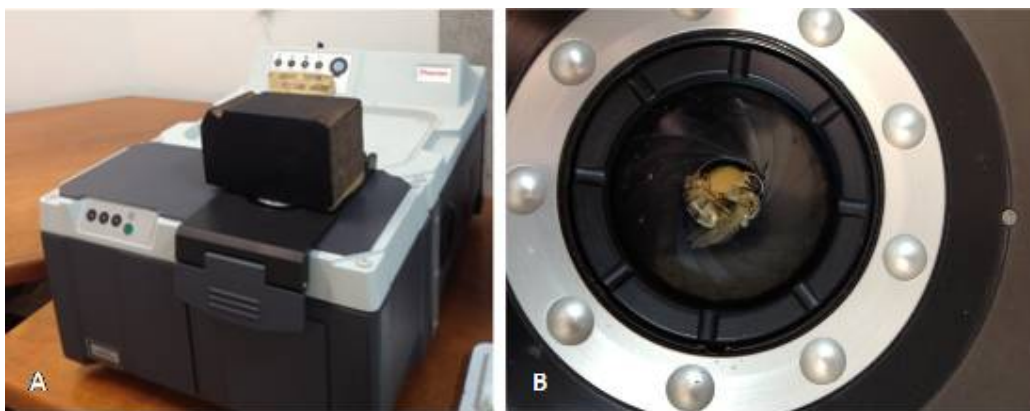
Para conseguir um número maior de amostras de rainha tentou-se a produção induzida colocando-se na colmeia um favo com realeiras artificiais. Ainda assim não foi possível coletar um número maior de rainhas.

### 3.4. Coleta Espectral

Para início da leitura espectral fez-se uma calibração (branco) do equipamento. A cada 50 leituras espectrais o equipamento era novamente calibrado. Para cada leitura foram feitas 16 varreduras por espectro.

As leituras espectrais foram expressas pelos valores de absorbância entre os números de onda de 4.000 a 10.000 ( $\text{cm}^{-1}$ ) no infravermelho próximo.

O espectro foi obtido no aparelho *Antaris II FT-NIR Analyzer* (Thermo Scientific) mantido pelo Programa de Pós-Graduação de Botânica do INPA (Figura 6) e foram feitas as leituras do ovo, larva e adulto, para o estabelecimento/reconhecimento de padrões de espectro peculiares a cada sexo e casta.



**Figura 6:** Espectroscopia no Infravermelho Próximo. **A** - Aparelho *Antaris II FT-NIR Analyzer* no qual foram realizadas as leituras espectrais. **B** - Ferramenta auxiliar “Diafragma” para posicionamento da amostra no Aparelho *Antaris II FT-NIR Analyzer*.

Para a realização da leitura e posicionamento da amostra foi utilizado uma ferramenta auxiliar “diafragma”. Para evitar a dispersão da luz foi utilizado sobre o diafragma um corpo negro, cobrindo o ponto de captura do espectro.

Foi coletada uma leitura para ovo na posição horizontal (HO) e duas leituras espectrais para larva e adulto, sendo uma pela parte dorsal (DS) e a uma pela lateral direita (LT) do indivíduo, totalizando 576 espectros.

Não houve o pré-processamento dos espectros, as regiões com “ruído” não foram detectadas e eliminadas mediante a visualização dos espectros previamente às análises estatísticas, sendo assim as análises foram feitas com os dados brutos, sendo.

### 3.5. Análise Estatística

As análises estatísticas dos dados referentes a Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS) foram feitas com o auxílio do programa R 2.14.0 (R Core Development Team, 2012).

Foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) para avaliar o comportamento espectral das amostras e verificar qual a posição de leitura que melhor separa os espectros para sexo e casta.

Foram geradas funções discriminantes com o intuito de avaliar o potencial dos dados em distinguir corretamente o sexo e a casta das amostras. A partir da análise discriminante linear (LDA) pode-se utilizar uma série de amostras externas para verificar a capacidade de predição do modelo de calibração desenvolvido (Berrueta *et al.*, 2007). O desenvolvimento de um modelo robusto, em que todas as amostras apresentem uma boa correlação, possibilita a predição de outras amostras com análises comparativas rápidas e eficientes (Sousa *et al.* 2011).

Para testar a predição discriminante foram feitas duas análises. Primeiramente realizou-se uma análise com um modelo construído com 70% dos indivíduos para gerar um modelo discriminante; os demais, 30% dos indivíduos, formaram o “dado teste”, que foi utilizado para validar o modelo. Deste modo, uma função discriminante foi gerada, e posteriormente foi previsto o possível grupo ao qual a amostra testada pertence. Foram realizadas 100 análises discriminantes com dados *teste* e *modelo* construídos a partir da seleção aleatória de apenas uma leitura por indivíduo a cada vez. Assim, a cada permutação a composição dos conjuntos de dados *teste* e *modelo* foram diferentes em relação aos indivíduos e também em relação aos espectros de cada indivíduo.

A porcentagem de acerto de cada permutação foi computada como a porcentagem de indivíduos que tiveram sua identificação validada pelo modelo, e porcentagem geral para este teste foi computada pela média das 100 randomizações realizadas.

Logo depois empregou-se a técnica de validação cruzada, denominada “Leave one out” que em português significa “deixar um de fora”. Esta validação utiliza K-1 amostras para gerar uma função discriminante e a amostra “leave one out” serve para validar o modelo. Uma função discriminante é gerada, e posteriormente, é previsto o possível grupo ao qual pertence essa amostra eliminada do modelo. Primeiramente foi selecionada, aleatoriamente, apenas uma leitura espectral entre as duas leituras coletadas por indivíduo, para gerar as equações e posteriormente, foram filtradas as posições fazendo o “leave one out” com apenas uma das posições. O intuito deste teste foi observar se é necessária a utilização de várias posições na

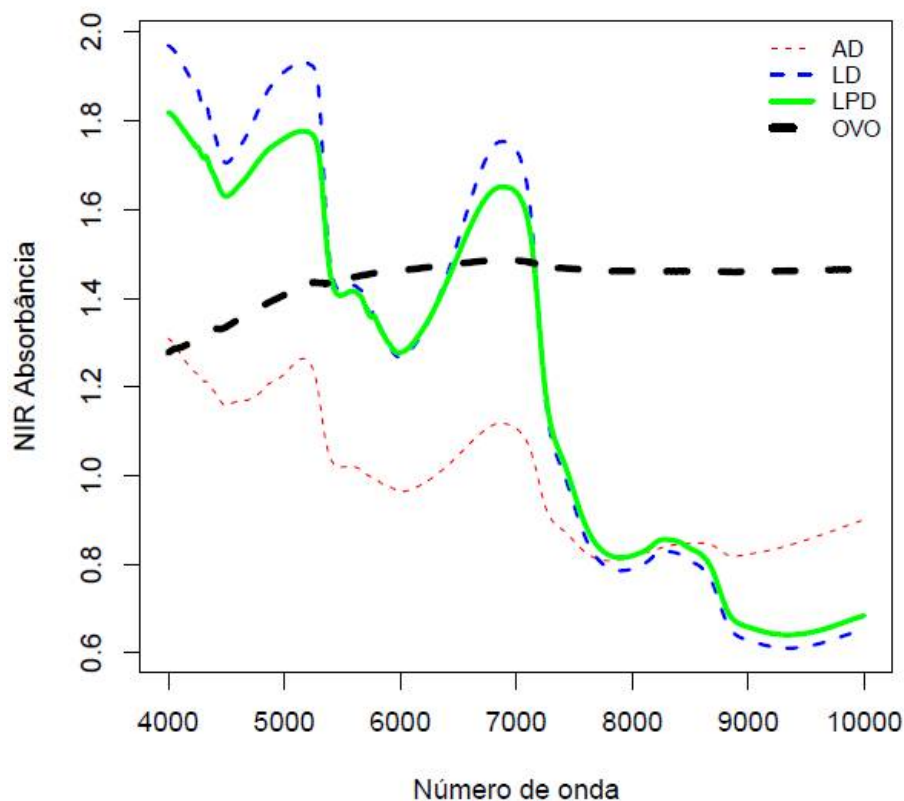
leitura para alcançar bons resultados. Como resultado, obteve-se a percentagem de acertos na validação para predizer a que sexo e casta pertencem pelos modelos gerados.

Estabeleceu-se aleatorização com 100 repetições e, em seguida, procedeu-se a avaliação das funções discriminantes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Padrões espectrais de indivíduos de *Apis mellifera*

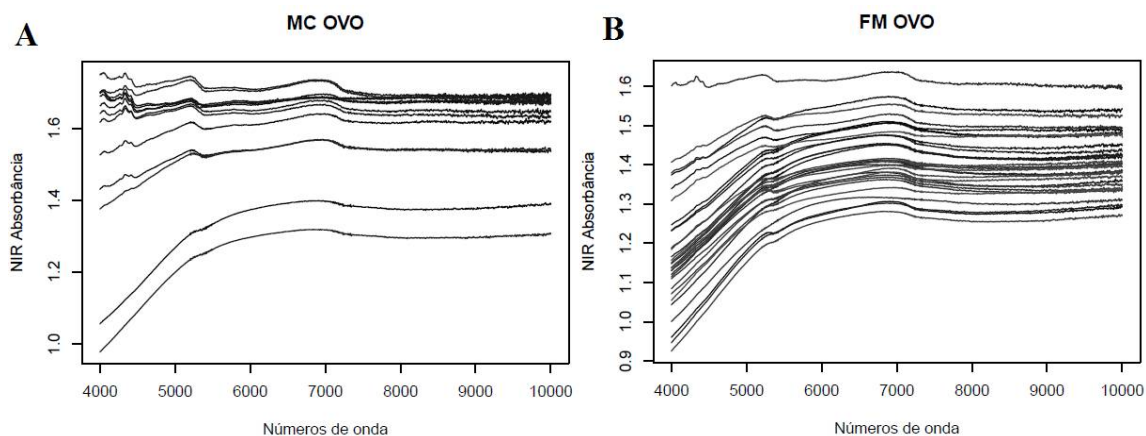
Por meio das leituras feitas pelo aparelho *FT-NIR Analyzer*, foram gerados padrões de espectros para as fases de desenvolvimentos (Ovo, Larva LPD, Larva LD e Adultos recém-emergidos), os quais podem ser visualizados na figura 7.



**Figura 7:** Padrões dos espectros de amostras nas diferentes fases de desenvolvimento obtidas no NIRS. **Tracejado Vermelho Fino** – Adulto (AD); **Tracejado Azul Médio** – Larva defecante (LD); **Linha Contínua Verde** – Larva pré-defecante (LPD); **Tracejado Preto Grosso** – Ovo.

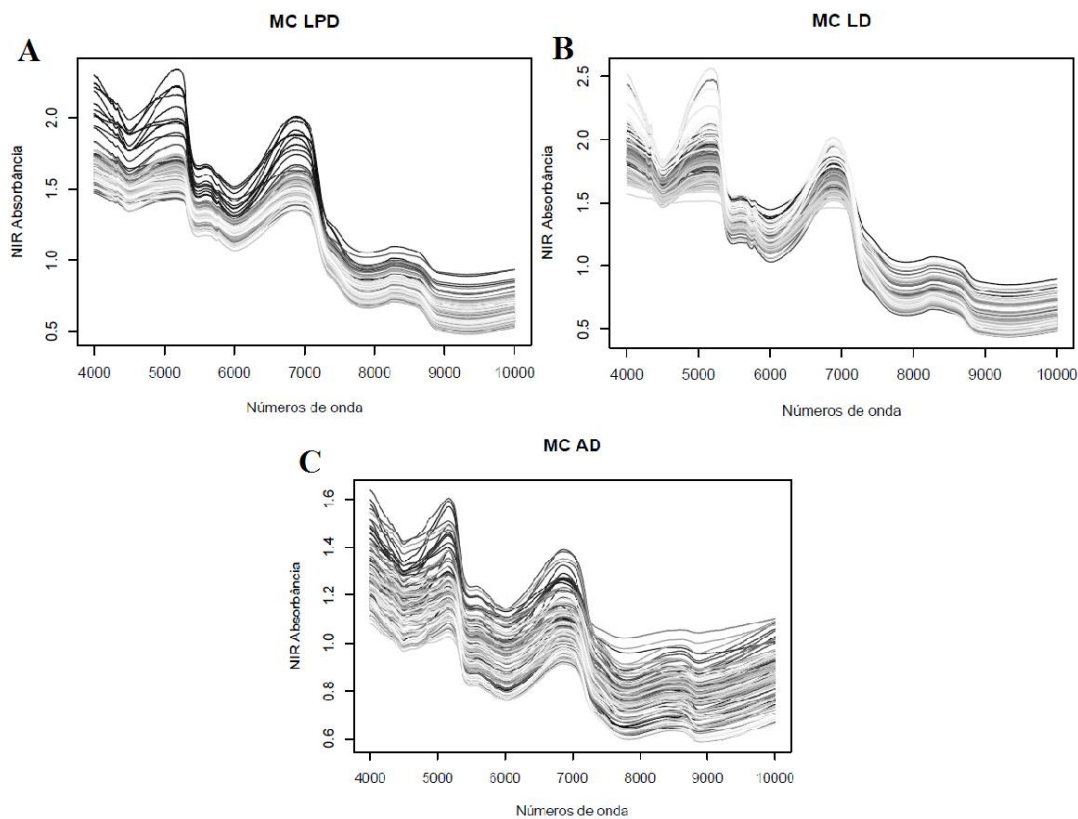
Pode-se notar que ocorre um padrão característico de espectro para todos os indivíduos na mesma fase de desenvolvimento (Ovo, Larva e Adulto). O número de absorbância do ovo é menor que para as demais fases e, observa-se que as fases de larva apresentam um perfil semelhante de espectro, certamente em decorrência de serem estágios contíguos temporalmente.

Também foi possível verificar que o padrão espectral em relação ao número de absorbância é diferente entre ovos de machos e de fêmeas (Figura 8).

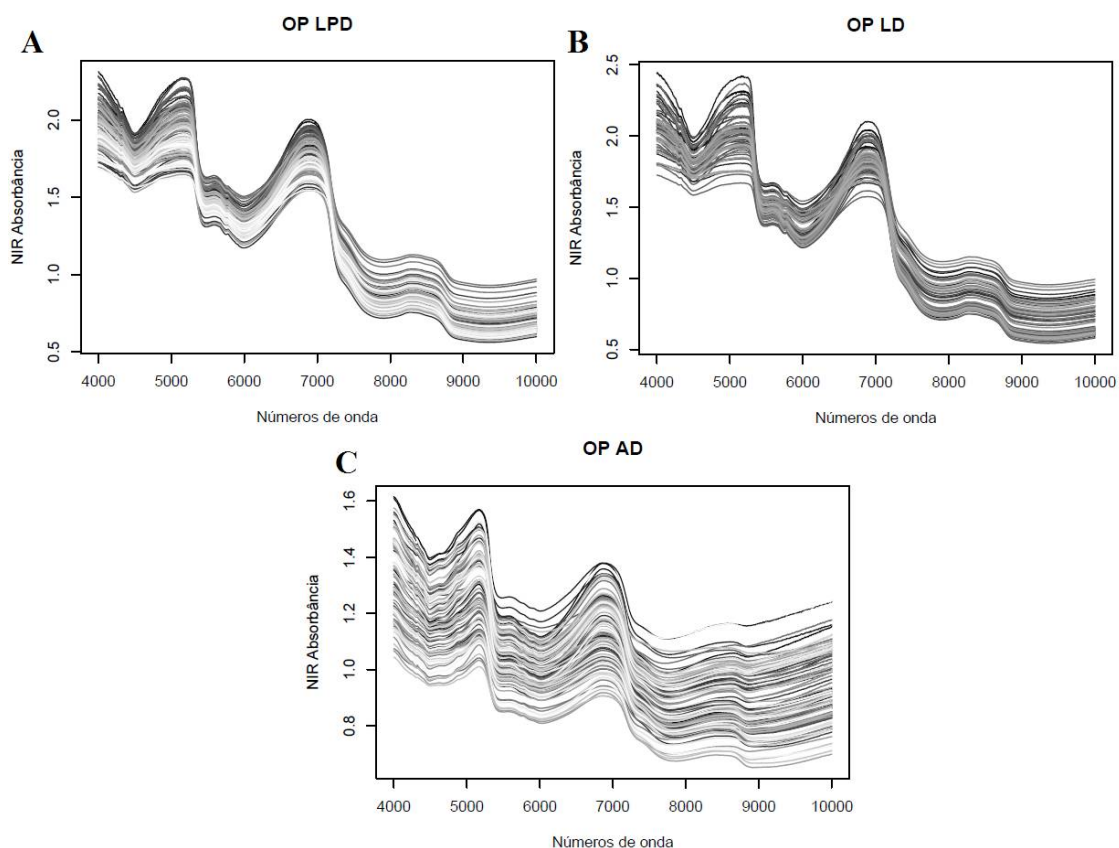


**Figura 8:** Padrões do espectro de ovo de amostras de *Apis mellifera* resultantes das leituras espectrais obtidas no FT-NIRS. **A**–Espectro de Ovo de Macho (MC); **B**–Espectro de Ovo de Fêmea (FM).

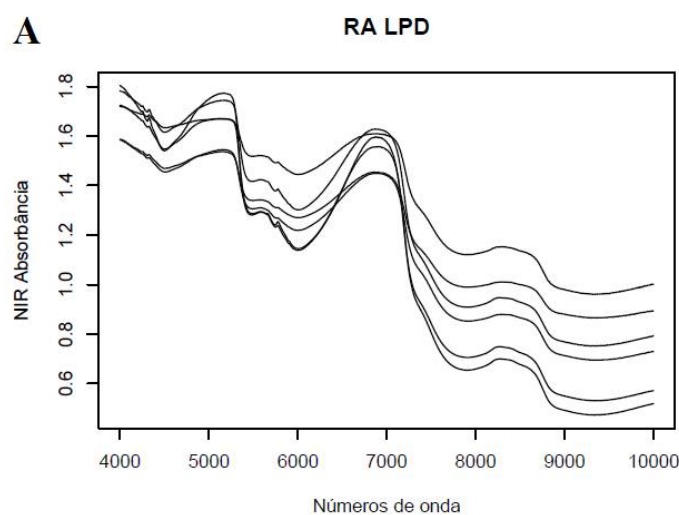
Depois de visualizado o padrão de espectros para as diferentes fases (Figura 7), também foi possível uma visualização do padrão geral de espectros para os diferentes sexos (macho e fêmea) e casta (operária e rainha) (Figura 9, Figura 10, Figura 11).



**Figura 9:** Padrões individuais de amostras de macho (MC) de *Apis mellifera* resultantes das leituras espectrais obtidas no FT-NIRS. **A**–Espectro de Macho na fase de Larva Pré-Defecante (LPD); **B**–Espectro de Macho na fase de Larva Defecante (LD); **C**– Espectro de Macho na fase de Adulto (AD).



**Figura 10:** Padrões individuais de amostras de operárias (OP) de *Apis mellifera* resultantes das leituras espectrais obtidas no FT-NIRS. **A**–Espectro de Operária na fase de Larva Pré-Defecante (LPD); **B**– Espectro de Operária na fase de Larva Defecante (LD); **C**– Espectro de Operária na fase de Adulto (AD).



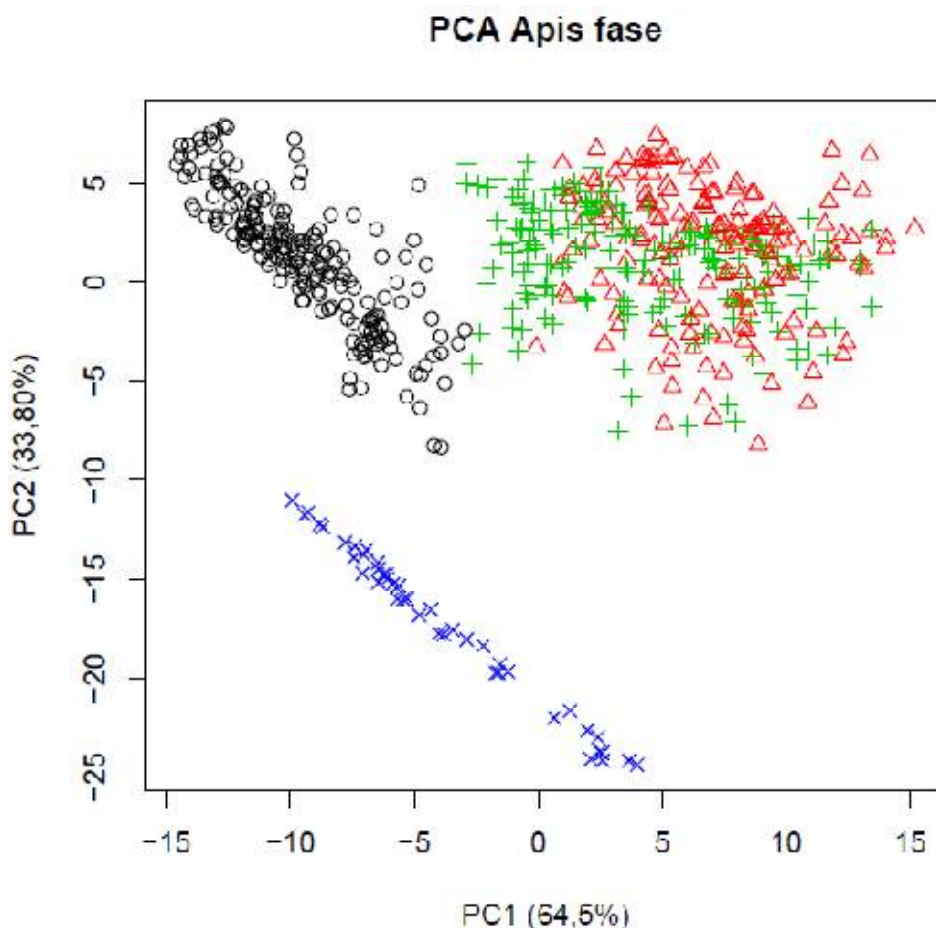
**Figura 11:** Padrões individuais de amostras de rainha (RA) de *Apis mellifera* resultantes das leituras espectrais obtidas no FT-NIRS. **A**–Espectro de Rainha na fase de Larva Pré-Defecante (LPD).



Portanto, foi possível diferenciar os sexos e castas em cada uma das fases analisadas com base nos espectros gerais. Tais espectros foram analisados por PCA (Análise de Componentes Principais) e LDA (Análise Discriminante Linear), as quais serão discutidas adiante.

#### 4.2. Análise de Componentes Principais (PCA)

Na primeira análise de componentes principais (PCA) pode-se notar que a ordenação dos indivíduos em duas dimensões (dorsal e lateral) captou 98,29% da variação para os espectros brutos na faixa de comprimento de onda de 4000 a 10000  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao infravermelho próximo (Figura 12).

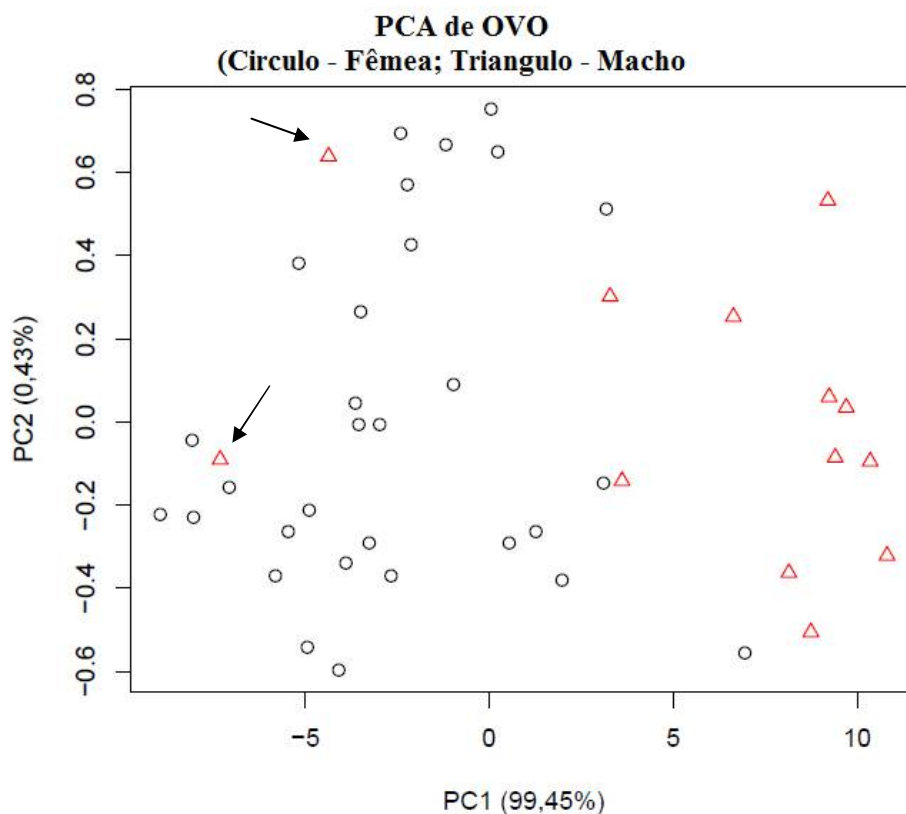


**Figura 12:** Análise de Componentes Principais (PCA) em duas dimensões explicando 98,29% da variação espectral por NIRS de diferentes fases em *Apis mellifera*. **X Azul** – Ovo; **Circulo Preto** – Adulto; **Cruz Verde** – Larva pré-defecante (LPD); **Triangulo Vermelho** – Larva Defecante (LD);

Os indivíduos em fases de ovo e adulto foram precisamente separados, sendo que as larvas em fases adjacentes temporalmente (LPD e LD) se aproximaram no espaço. Estes resultados nos indicam uma similaridade na resposta espectral para cada fase, permitindo inferir que a composição cuticular deve variar de acordo com as fases do desenvolvimento.

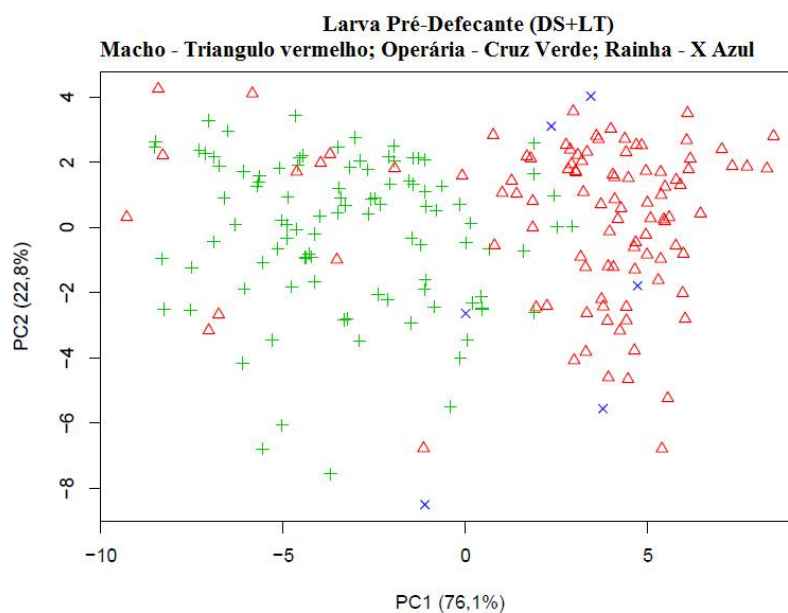
Com a possibilidade de separação das diferentes fases pelos espectros, prosseguiu-se a análise de similaridade espectral para tentar distinguir os sexos e castas em cada uma das fases. Primeiramente foi realizada uma PCA com os espectros obtidos para ovo (Figura 13).

Pode se notar que a ordenação dos indivíduos em duas dimensões captou 99,88% da variação dos espectros. As ordenações das leituras espectrais, utilizando todos os comprimentos de onda, permitiram inferir que dentro da fase de ovo há, em geral, uma clara formação de dois grupos permitindo distinguir ovos de fêmeas de ovos de machos. Apenas duas amostras (4,65%) se misturam no espaço (Figura 13 – Flechas).

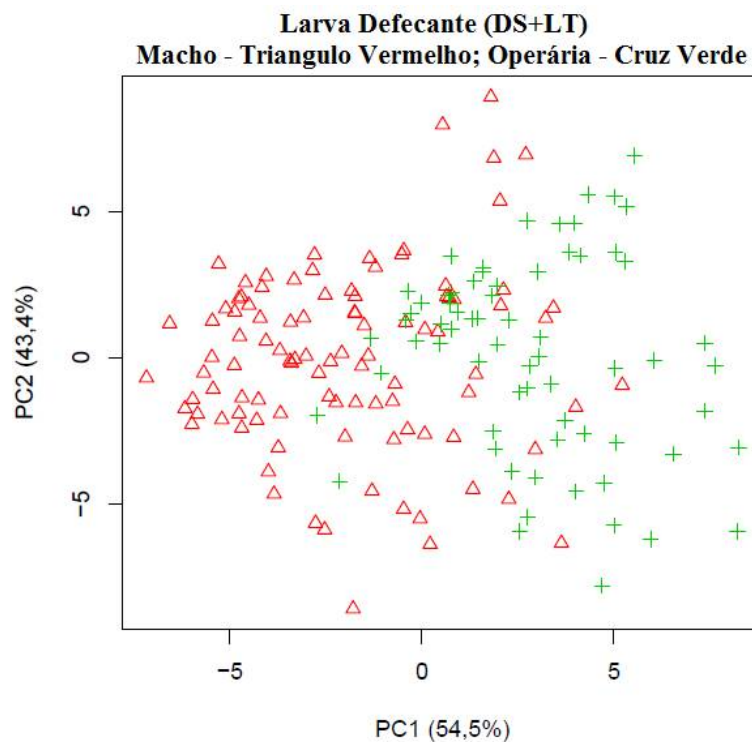


**Figura 13:** Análise de Componentes Principais (PCA) em duas dimensões explicando 99,88% a similaridade espectral do sexo dos ovos de *Apis mellifera*. **Circulo Preto** – Fêmea; **Triangulo Vermelho** – Macho. As flechas indicam as duas amostras de macho que se misturaram no espaço com as fêmeas.

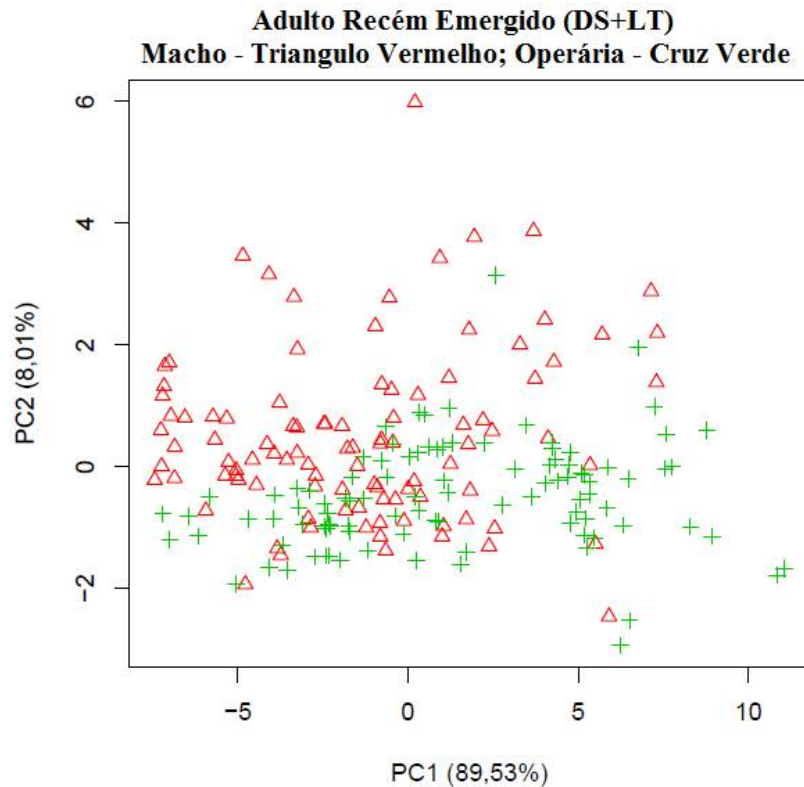
Para as demais fases (LPD, LD e Adulto) foram feitas PCAs considerando-se as duas posições dorsal e lateral simultaneamente, ou seja, sem identificação de posição. Nesses casos verificou-se (Figura 14, Figura 153 e Figura 16) que nas diferentes fases do desenvolvimento foi captado mais de 97% da variação dos espectros, sendo possível separar os sexos a partir dos espectros. Em todas as fases observou-se mistura de amostras no espaço não permitindo a precisa indicação do sexo para estas amostras.



**Figura 14:** Análise de Componentes Principais (PCA) em larvas Larvas Pré-Defecantes (LPD) considerando as posições Dorsal (DS) + Lateral (LT).

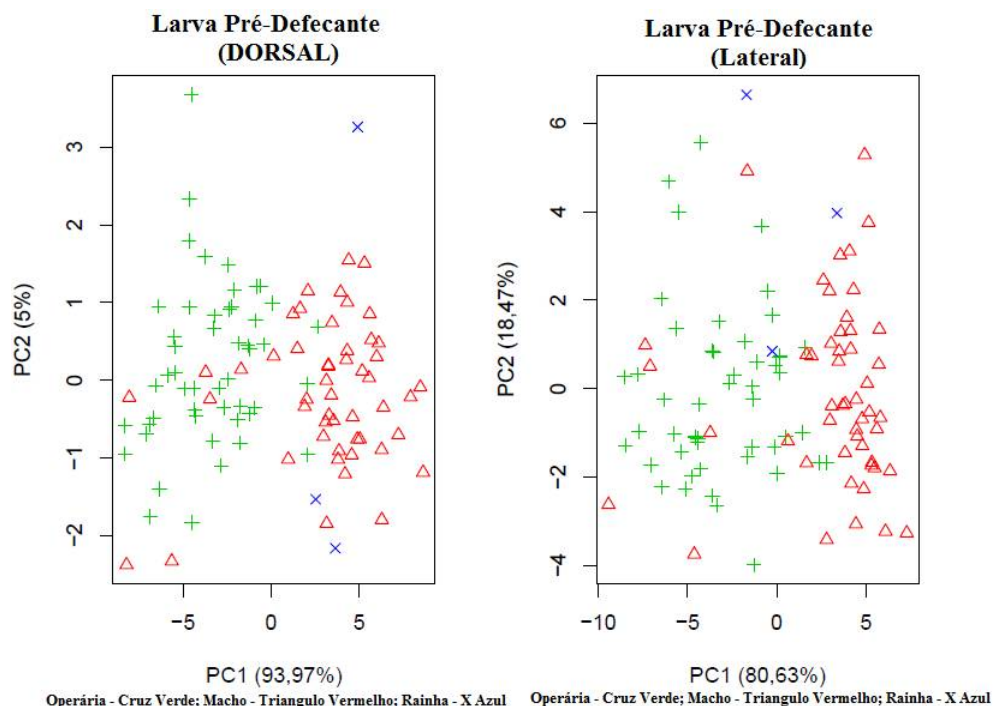


**Figura 15:** Análise de Componentes Principais (PCA) em larvas Larvas Defecantes (LD) considerando as posições Dorsal (DS) + Lateral (LT).

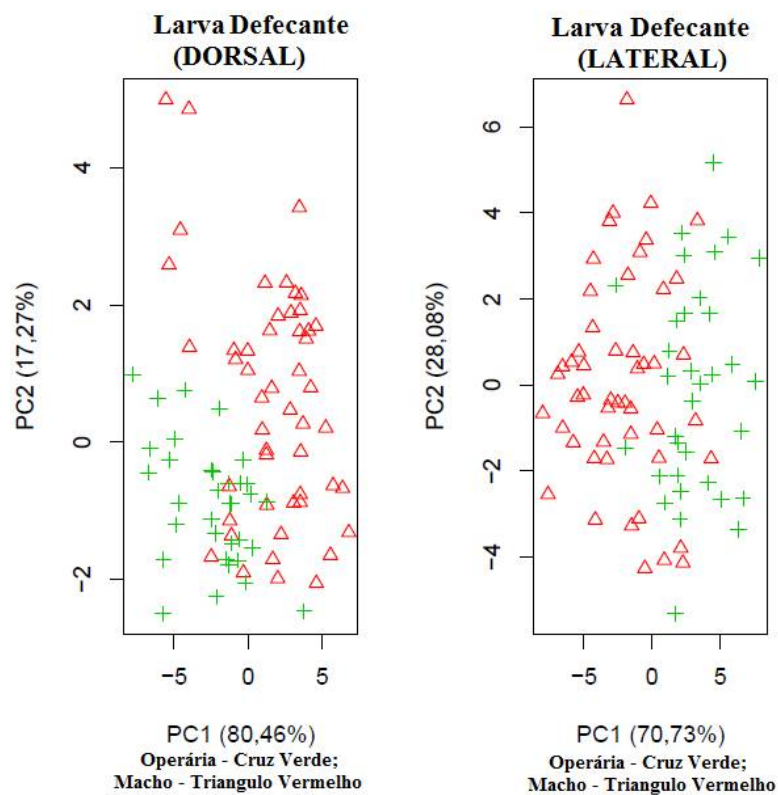


**Figura 16:** Análise de Componentes Principais (PCA) em Adultos recém-emergidos (AD) considerando as posições Dorsal (DS) + Lateral (LT).

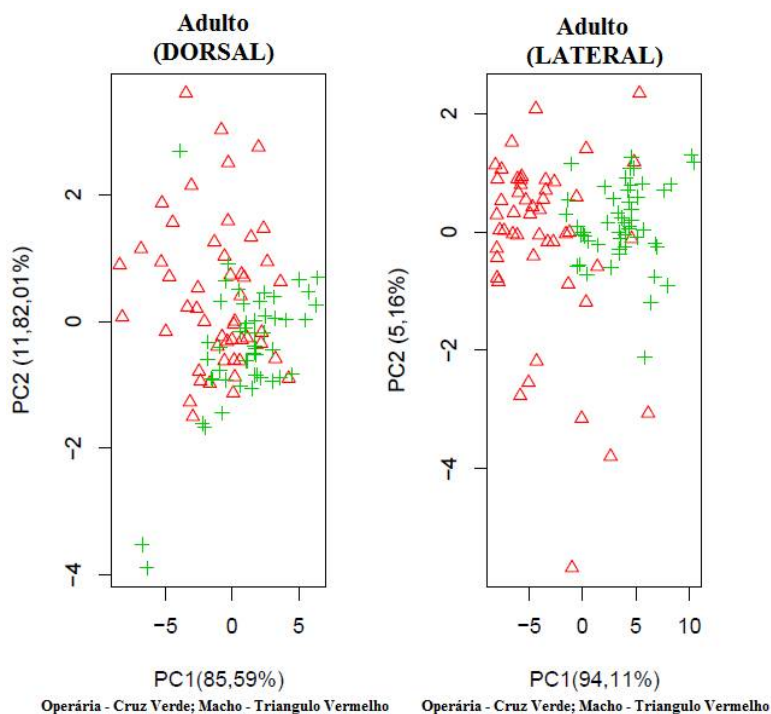
Para verificar qual a melhor posição para reconhecer sexo/casta nas diferentes fases, outras PCAs foram feitas filtrando-se as duas posições de obtenção dos espectros (Figura 17, Figura 18 e Figura 19). Novamente, os eixos de ordenação conseguiram captar, em todos os casos, mais de 97% da variação dos dados espectrais e a separação dos sexos/castas se tornou nítida para a maioria dos indivíduos. Embora tenham ocorrido algumas misturas, ambas as posições (dorsal e lateral) apresentaram potencial para distinguir sexo. Porém, a posição lateral apresentou menor erro. Isso talvez seja devido ao posicionamento do indivíduo no “diafragma” do equipamento, pois na condição lateral o indivíduo se encaixava melhor (Figura 5) e o aparelho conseguia ler o corpo inteiro, diferente da posição dorsal onde tanto as larvas quanto os adultos ficavam com o corpo levemente curvado, impossibilitando que o espectro atingisse todo o corpo do indivíduo.



**Figura 17:** Análise de Componentes Principais (PCA) em duas dimensões explorando separadamente as duas posições (Lateral e Dorsal) em que as leituras espectrais foram feitas na fase de desenvolvimento Larva Pré-Defecante (LPD) para indivíduos de *Apis mellifera*.



**Figura 18:** Análise de Componentes Principais (PCA) em duas dimensões explorando separadamente as duas posições (Lateral e Dorsal) em que as leituras espectrais foram feitas na fase de desenvolvimento Larva Defecante (LD) para indivíduos de *Apis mellifera*.



**Figura 19:** Análise de Componentes Principais (PCA) em duas dimensões explorando separadamente as duas posições (Lateral e Dorsal) em que as leituras espectrais foram feitas na fase de desenvolvimento Adulto recém-emergido para indivíduos de *Apis mellifera*.

Pode-se notar, com base nas PCAs da fase de LPD, que esta foi à única fase onde foi possível a separação dos indivíduos quanto aos sexos e castas, uma vez que somente nesta fase foi possível obter amostras pra ambos os sexos e castas. Apesar disso, observa-se que os indivíduos classificados como rainha tendem a ficar mais próximos aos machos.

Há necessidade de ampliação do número de amostras e reavaliação dos dados referentes as rainhas, pois o número amostral obtido, apesar dos esforços, foi pequeno impossibilitando a diferenciação de casta nas fases de LD e Adulto recém emergido.

### 4.3. Análise Discriminante Linear – Dados Modelo vs Dados Teste

Demonstrou-se por meio da validação cruzada, que foi possível separar com alto poder de discriminação, o sexo nas fases de ovo, LD e Adulto recém emergido, e casta para a fase de LPD dos indivíduos de *Apis*, testados com base na análise discriminantes obtida pelo espectro NIRS. As médias de acertos para as diferentes fases estão descritas na tabela 3.

**Tabela 3:** Média das probabilidades de identificação correta (acertos) na Analise Discriminante Linear - Modelo vs Teste com 100 randomizações.

<b>Fase</b>	<b>70% - 30%</b>
Ovo	96,0%
LDP	100,0%
LD	100,0%
Adulto	99,9%

Legenda: LPD – Larva pré-defecante; LD – Larva defecante.

A probabilidade de se identificar corretamente um indivíduo com base nos dados espectrais foi superior a 96%. As análises discriminantes realizadas indicaram uma alta acuracidade dos dados espectrais para a identificação de sexo e casta.

#### **4.4. Análise Discriminante Linear – “Leave One Out”**

A técnica utilizada “leave one out” encontrou uma probabilidade correta de identificação dos indivíduos, selecionando aleatoriamente apenas um espectro para representar cada indivíduo. As médias das probabilidades de acerto variaram de 100% a 86% como descrito na tabela 4.

**Tabela 4:** Média das probabilidades de identificação correta (acertos) na Analise Discriminantes Linear – Leave one out com 100 randomizações.

<b>Fase</b>	<b><i>Leave one out</i></b>
Ovo	86,0%
LPD	98,5%
LD	100,0%
Adulto	98,0%

Legenda: LPD – Larva pré-defecante; LD – Larva defecante.

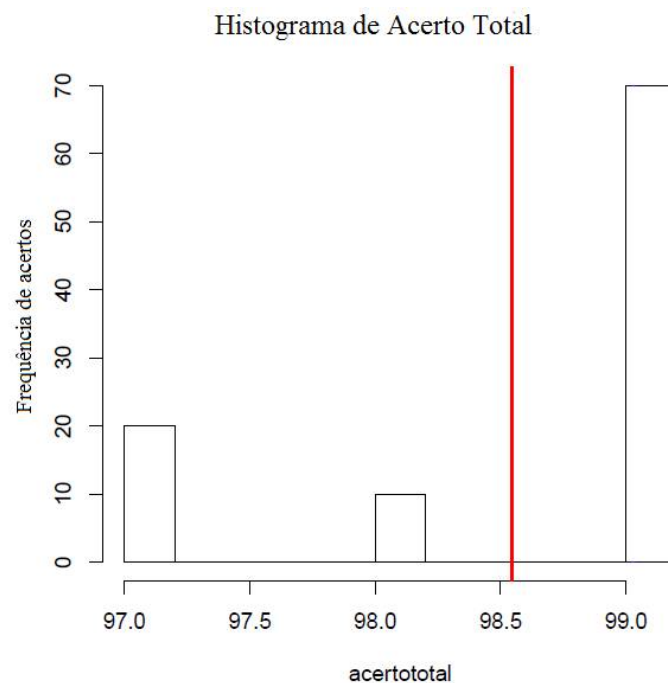
Para a fase de ovo tivemos uma média de acerto de 86% nas predições. Porém em seis indivíduos ocorreram erros (Tabela 5).

**Tabela 5:** Predições incorretas para ovo na Análise Discriminantes Linear – “Leave one out” com 100 randomizações.

Classe <sup>1</sup>	FM <sup>2</sup>	MC <sup>2</sup>	Identificação	Nº Acertos	Nº Erros	Nenhuma predição
FM	0.89	0.11	APIS11	0	0	100
MC	0.99	0.01	APIS31	0	100	0
MC	0.77	0.23	APIS32	0	0	100
MC	0.39	0.61	APIS41	0	0	100
MC	1	0	APIS42	0	100	0
MC	0.72	0.28	APIS43	0	0	100

Legenda: FM – fêmea; MC – macho. <sup>1</sup> – Identificação prévia com base na estrutura da célula de origem da amostra. <sup>2</sup> – Identificação pela LDA.

Para a fase de larva pré-defecante (LPD) a predição ficou em torno de 98,5% (Figura 20). Ocorreram erros principalmente nas predições das rainhas. Para LPD foram coletadas três rainhas, porém o indivíduo *Apis 330* estava bastante jovem e ainda não tinha ocorrido a completa alimentação. Nas espécies da tribo Apini, a diferenciação de castas é determinada pela quantidade e qualidade de alimento recebido pelas larvas (Barchuk *et al.*, 2007). Sendo assim nas 100 randomizações, esse indivíduo foi predito como operária e não como rainha.



**Figura 20:** Histograma de Análise Discriminante Linear (LDA) na fase de larva pré-defecante de *Apis mellifera* com média em torno de 98,5%.



É visto no histograma que mesmo com o erro da rainha certa de 70 das 100 randomizações foram preditas com cerca de 99% de acertos.

Também ocorreu erro para os indivíduos *Apis* 245, *Apis* 328 e *Apis* 329, porém na maioria das vezes houve a predição correta (Tabela 6).

**Tabela 6:** Predições incorretas para larva LPD na Análise Discriminantes Linear – “Leave one out” com 100 randomizações.

Classe <sup>1</sup>	MC <sup>2</sup>	OP <sup>2</sup>	RA <sup>2</sup>	Identificação	NºAcertos	NºErros	Nenhuma predição
OP	0.05	0.95	0	APIS245	90	6	4
RA	0	0	1	APIS328	80	19	1
RA	0	0	1	APIS329	80	18	2
RA	0	1	0	APIS330	0	100	0

Legenda: OP – Operária; RA – Rainha. <sup>1</sup> – Identificação prévia com base na estrutura da célula de origem da amostra. <sup>2</sup> – Identificação pela LDA.

Para os indivíduos cujas leituras foram feitas na fase de larva defecante (LD) houve a predição correta em 100% das randomizações. Já para as 100 randomizações referentes aos adultos recém emergidos a média obtida foi de 98% ocorrendo alguns erros nas predições (na maioria para os machos) (Tabela 7).

**Tabela 7:** Predições incorretas para Adultos recém-emergidos na Análise Discriminante Linear – Leave one out com 100 randomizações.

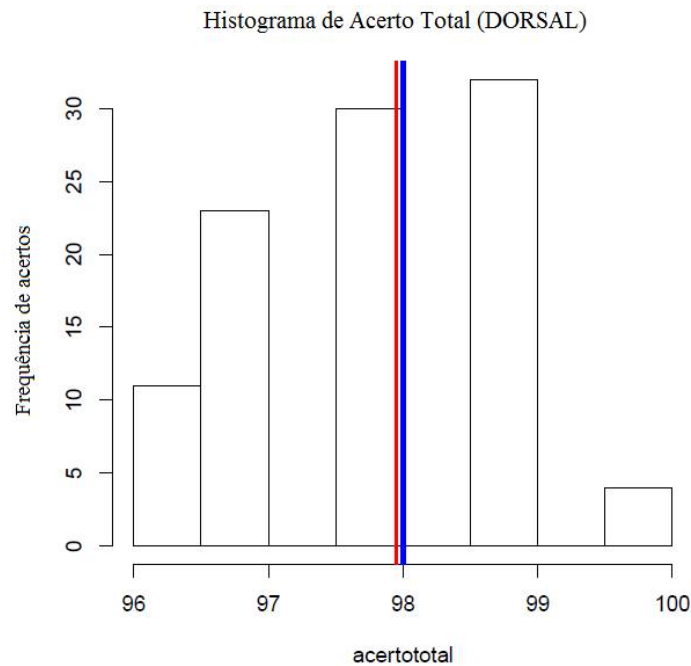
Classe <sup>1</sup>	MC <sup>2</sup>	OP <sup>2</sup>	Identificação	NºAcertos	NºErros	Nenhuma predição
MC	1	0	APIS144	89	6	5
MC	0	1	APIS146	55	29	16
MC	1	0	APIS147	99	0	1
MC	1	0	APIS149	98	0	2
MC	1	0	APIS151	57	38	5
MC	1	0	APIS159	97	0	3
MC	0	1	APIS167	25	43	32
MC	1	0	APIS171	99	0	1
MC	0.99	0.01	APIS175	92	1	7
MC	0.99	0.01	APIS176	99	0	1
MC	1	0	APIS180	99	0	1

MC	1	0	APIS188	99	0	1
MC	1	0	APIS189	99	0	1
MC	1	0	APIS193	95	1	4
OP	0	1	APIS219	99	0	1
OP	0	1	APIS231	99	0	1
OP	0	1	APIS235	99	0	1

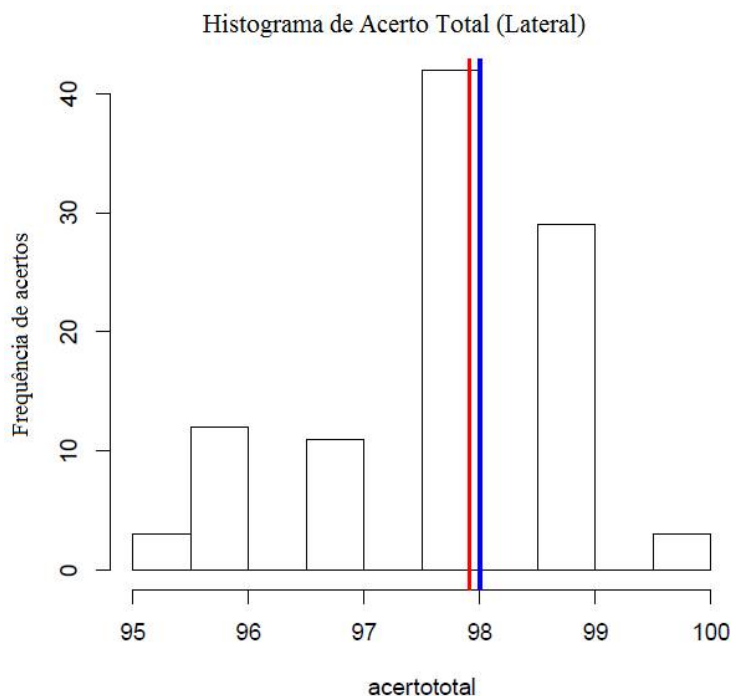
Legenda: MC – macho; OP – Operária. <sup>1</sup> – Identificação prévia com base na estrutura da célula de origem da amostra. <sup>2</sup> – Identificação pela LDA.

Mesmo com alguns erros nas predições o programa identificou apenas dois indivíduos incorretamente, foram eles *Apis 146* e *Apis 167*.

Como a fase de adulto recém-emergido apresentou uma maior quantidade de erros, foi feita LDAs separadamente para as posições, dorsal e lateral, porém não houve diferença para as médias das LDAs, que para as duas posições foi de 98%, como pode ser notado nos histogramas (Figura 21 e Figura 22).



**Figura 21:** Histograma de Análise Discriminante Linear (LDA) na fase de Adulto recém-emergido e na posição Dorsal em *Apis mellifera* com média em torno de 98%. (Média em Vermelho e Mediana em Azul).



**Figura 22:** Histograma de Análise Discriminante Linear (LDA) na fase de Adulto recém-emergido e na posição Lateral em *Apis mellifera* com média em torno de 98%. (Média em Vermelho e Mediana em Azul).

Mesmo não havendo diferença de média para as duas posições (dorsal e lateral), pode notar-se nos histogramas que a frequência de acertos para a posição lateral é um pouco maior do que para a dorsal. Na posição dorsal cerca de 70 das 100 randomizações foram acima de 98%, enquanto que para a lateral cerca de 75 das 100 randomizações foram acima de 98%.

## 5. DISCUSSÃO

---

Para cada fase (Ovo, larva pré-defecante, Larva defecante e adulto recém emergido) foi visto um perfil espectral característico o que sugere alguma forma de impressão digital para cada fase. Uma classificação bem sucedida que usa padrões moleculares tem sido útil para a classificação de espécies morfológicamente semelhantes. Por exemplo, os hidrocarbonetos cuticulares, de insetos que têm como funções básicas a impermeabilização da cutícula contra a perda de água além de constituírem uma barreira contra a invasão do organismo contra patógenos (Gibbs 2002). Vários autores registraram que a composição de hidrocarbonetos cuticulares varia entre as espécies, entre os sexos e os estágios de desenvolvimento dos insetos (Lockey 1991, Sledge *et al.* 2001). Tais observações podem explicar a sobreposição dos espectros das larvas LPD e LD na PCA de fase, provavelmente pela presença de hidrocarbonetos semelhantes em ambas as fases, as quais são temporalmente consecutivas no desenvolvimento ontogenético desses indivíduos.

Estudos anteriores, usando espectroscopia NIR com insetos, (Lazzari *et al.* 2010), discriminados entre um máximo de três espécies de vizinho táxons e estudos com mais espécies foram bem sucedidos, mas as espécies eram muito diferentes. A utilização da Análise de Componentes Principais (PCA), no trabalho de Fernández *et al.* 2011 mostrou padrões congruentes separando as diferentes espécies. Em todos os 21 intervalos espectrais usadas com Análise Discriminante (DA), a informação estava disponível para a discriminação correta de todas as nove espécies utilizadas em seu trabalho. Foi encontrado índice de 100% de correta discriminação de nove espécies de insetos congêneres.

Na Análise de Componentes Principais (PCA) na fase de Larva pré-defecante pode-se notar que os indivíduos com casta de rainha tenderam a se aproximar mais dos machos do que das fêmeas. Porém, morfológicamente, a literatura demonstra que, quando adultas, rainhas de *Apis mellifera* são mais parecidas com as operárias do que com os machos. Tal semelhança faz com que os apicultores iniciantes tenham dificuldade em distingui-las visualmente. Campos (1979) comparando diversos caracteres morfológicos entre os sexos e castas em abelhas de *Apis mellifera* demonstraram que as rainhas são mais semelhantes às operárias do que com os machos. No entanto, parece não haver registros de tais semelhanças em fases imaturas de abelhas *Apis mellifera*, o que deve ser investigado. Esse agrupamento das rainhas com os machos pode ser explicado através de efeitos físicos, no caso tamanho das larvas e não

químico. As larvas pré-defecantes de rainha e macho possuem tamanhos semelhantes, sendo as duas em tamanho maior que as da operária, elas também podem absorver uma quantidade de luz diferente da operária, o que faz com que elas se agrupem no espaço.

Para eliminar a possibilidade dos efeitos físicos nos resultados é recomendado o uso de pré-tratamentos quimiométricos. Esse pré-tratamento ajuda a eliminar ou diminuir os efeitos físicos, ficando apenas com dados de composição química das amostras independentes de efeitos físicos.

As regiões espectrais possuem vibrações moleculares fundamentais e harmônicas de grupos químicos funcionais distintos. Assim, pode-se afirmar que a espectroscopia NIR permite a quantificação do fenótipo molecular, que é feita a média a partir dos modos de todas as moléculas presentes na amostra de vibração (Fernández *et al.* 2011).

O stepwise é feito para obter as partes dos espectros que poderiam ser mais informativas, nele se acha as variáveis mais importantes e também poderia mostrar uma possibilidade de associar moléculas (lipídios, proteínas, etc) ou grupos funcionais delas. Porém, para um primeiro ensaio utilizando os dados brutos para as análises de PCA e Análise discriminante demonstrou-se que a técnica NIRS possui potencial.

Existe uma grande dificuldade na determinação de sexo e casta em fases precoces de espécies de abelhas porem utilizando a técnica de NIRS foram obtidos resultados em torno de 86% de acerto para a determinação de sexo e casta. Dowell *et al.* 2005 utilizou a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo como opção para a sexagem da mosca tsé-tsé, onde pupas podem ser sexados até cinco dias antes da emergência, porem com erros que geralmente variaram de 80 a 100%. Se a idade de pupa é conhecida com precisão, em seguida, um modelo específico para esse grupo etário resulta na melhor a precisão da classificação. Modelos que incluíram uma gama de faixas etárias resultaram na precisão da classificação mais baixa para algumas faixas etárias. A idade fisiológica aproximada pode então ser determinada a partir destes dados preliminares e uma calibração adequada, por exemplo, examinando a relação da absorvância a 950 e 1600nm ou a inclinação do espectro em torno de 1150 nm.

Para a espécie trabalhada *Apis mellifera* não houve a confirmação de sexo e casta, pois na espécie o sexo e casta são diferenciados pelo tamanho da célula de cria. Não foi feito esse acompanhamento, e os indivíduos eram retirados das células de cria e imediatamente

colocados no freezer -80°C. A possibilidade de um erro na ovoposição da rainha interfere nas análises mais que pelo tamanho amostral, e também existe a possibilidade de a NIRS ter detectado isso.

Para análises futuras serão feitas esses acompanhamentos da ovoposição e para espécies como *Melipona interrupta* que não existe a diferença no tamanho das células e nem na alimentação para a diferenciação de sexo e casta o acompanhamento para confirmação destes serão feitos retirando os indivíduos das células de cria e colocando-os em uma placa de Elisa para o acompanhando o seu desenvolvimento até a fase de adulto.

## 6. CONCLUSÃO

---

A técnica da Espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) mostrou ser uma ferramenta eficiente para auxiliar na separação das fases de ovo, larva pré-defecante, larva defecante e adulto recém-emergido em abelhas *Apis mellifera*.

Para todas as fases de desenvolvimento da abelha *Apis mellifera* onde foi feita a captura espectral no FT-NIRS obtive-se predições corretas, mostrando a eficiência na separação de sexo, porém por falta de indivíduos apenas na fase de larva pré-defecante foi possível a verificação da diferenciação de casta.

Nas fases de larva e adulto, em ambas as posições (dorsal e lateral), combinadas ou separadamente, foi possível distinguir os sexos, e na fase de larva pré-defecante também foi possível distinguir as castas.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

Este estudo é pioneiro no desafio de promover a identificação de sexos e castas em abelhas eussociais com fins de preservação amostral para uso em análises posteriores que requerem tais informações.

Esperamos que em um futuro próximo seja possível a criação de um banco de dados espectrais abrangendo diferentes fases do desenvolvimento para diferentes espécies de abelhas. A criação de um banco de dados espectral representaria um grande passo em contribuição à identificação de sexo e casta, principalmente em espécies que não apresentam diferenciação estrutural nas células de cria e cuja determinação sexual e de castas acontece durante as fases precoces do desenvolvimento. A impossibilidade de diferenciação morfológica dos imaturos demanda prioridade no uso de técnicas avançadas que permitam a identificação dos sexos e castas e preservação das amostras para estudos avançados em genética e outras áreas biológicas.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Alcácer, L.. 2007. Textos de apoio a Química-Física. Determinação da Estrutura Molecular. Métodos Espectroscópios. *AEIST*.
- Barchuk, A.R.; Cristino, A.S.; Kucharski, R.; Costa, L.F.; Simões, Z.L.P.; Maleszka, R. 2007. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Developmental Biology*, 7: 70-89.
- Beye, M.; Hasselmann, M.; Fondrk, M.K.; Page Jr. R.E.; Omholt, S.W. 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell*, 114: 419-429.
- Berrueta LA, Alonso-Salces RM, Héberger K. 2007. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography*, 1158: 196-214.
- Camargo JMF, Pedro SRM. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. pp. 272–578. In Moure JS, Urban D, Melo GAR, Eds. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. Sociedade Brasileira de Entomologia; Curitiba, Brasil.
- Campos, L.A.O.; Kerr, W.E. and Silva D.L.N. 1979. Sex determination in bees. VIII. Relative action of genes *xa* and *xb* on sex determination in *Melipona* bees. *Rev Bras Genet* 3:267-280.
- Carvalho, G.A. 2001. The Number of Sex Alleles (CSD) in a Bee Population and its Practical Importance (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 10(1): 10-15.
- Carvalho-Zilse, G.A.; Nunes-Silva, C.G. 2012. Threats to the Stingless Bees in the Brazilian Amazon: How to Deal with Scarce Biological Data and an Increasing Rate of Destruction. In: Florio, R.M (Ed.). *Bees: Biology, Threats and Colonies*. Nova Science Publishers, Chapter 4, 147-168pp.
- Carvalho-Zilse, G. A.; Vilas Boas, H. C.; Costa, K, B.; Nunes-Silva, C. G.; Souza, M. T.; Fernandes, R. S. 2012. Meliponicultura na Amazônia. *Elaboração Projeto Fronteiras: Alto Rio Negro*. 50p.

- Crane, P. R.; Friis, E. M. & Pedersen, K. R. 1995. The origin and early diversification of angiosperms. *Nat.* 374: 27-33. Dowell, F.E., Parker, A.G., Benedict, M.Q., Robinson, A.S., Broce, A.B. & Wirtz, R.A. (2005) Sex separation of tsetse fly pupae using near-infrared spectroscopy. *Bulletin of Entomological Research*, 95, 249–57.
- Dowell, F.E., Parker, A.G., Benedict, M.Q., Robinson, A.S., Broce, A.B. & Wirtz, R.A. 2005 Sex separation of tsetse fly pupae using near-infrared spectroscopy. *Bulletin of Entomological Research*, 95, 249–57.
- Durgante, F. M. 2012. Discriminação de espécies florestais com a utilização da razão isotópica  $^{13}\text{C}$   $^{15}\text{N}$  e as espectroscopia no infravermelho próximo (FT-NIRS). Dissertação de mestrado. Instituto de Pesquisas da Amazônia – INPA. Manaus. 77p.
- Durgante, F. M.; Higuchi, N.; Almeida, A.; Vicentini, A. 2013. Species Spectral Signature: Discriminating closely related plant species in the Amazon with Near-Infrared Leaf-spectroscopy. *Forest Ecology and Management* 291 (2013) 240–248.
- Feist, Patty. 2002. Handbook for Organic Chemistry Lab, 6th Edition, CU Chemistry Department, chapter 15. URL: <http://orgchem.colorado.edu/hndbksupport/irtutor/IRtheory.pdf>
- Fernández, J. I. R. 2008. Coenosiini neotropicais (musidae: díptera): taxonomia, filogenia e contribuição da espectroscopia no infravermelho próximo. Tese de doutorado, Universidade Federal Paraná. Curitiba, 159p.
- Fernández, J. I. R.; Carvalho, C. J. B.; Pasquini, C.; Lima, K. M. G.; Moura, M. O.; Arízaga, G. G. C. 2011. Barcoding without DNA? Species identification using near infrared spectroscopy. Accepted by R. Cruickshank: 14 Apr. 2011; published: 29 Jun.
- Foley, W. J.; McLiwee, A.; Lawler, I. Aragones, L. Woolnough, A. P. Berding, N. 1988. Ecological applications of near infrared reflectance spectroscopy – a tool for rapid, cost-effective prediction of the composition of plant and animal tissues and aspects of animal performance. *Oecologia*, 116: 293-305.

- Gibbs, A. G. 2002. Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *Journal of Insect Physiology* 48, 391-400.
- Gonçalves, L.S. 1994. A influência do comportamento das abelhas africanizadas na produção, capacidade de defesa e resistência à doenças. Anais do I Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto; p. 69-79.
- Gonçalves, L.S. 2001. Impactos biológicos causados pela africanização das abelhas *Apis mellifera* e pela competição das abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* com seu parasita obrigatório, o pseudoclone de *Apis mellifera capensis*. Anais do V Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto, p. 72-77.
- Grimaldi, D.A.; Engel, M.S. 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press, New York, NY, USA. 772pp.
- Gullan, P. J. & Cranston, P.S. 2007. Os insetos: um resumo de entomologia . Ed. Roca, São Paulo. 456 p
- Hasselmann M., Gempe T., Schiott M., Nunes-Silva C.G., et al. 2008. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway. *Nature* DOI:10.1038/nature07052.
- Herschel, W. 1800. Experiments on the Refrangibility of the Invisible Rays of the Sun. By Willian Herschel, LL. D. F. R. S.; Philosophical Transaction of the Royal Society, 90: 284-292.
- Kerr, W. E. 1992. Abejas africanas, su introduccion y expansion en el continente Americano. Subespécies e ecotipos africanos. *Industria Apícola*, 13: 12-21.
- Kerr, W. E.; Carvalho-Zilse, G. A.; Nascimento, V. A. 1996. Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação. Coleção Manejo da Vida Silvestre. Belo Horizonte: Acangáu. 143 p.
- Kerr, W. E.; Akahira, Y.; Camargo, C. A. 1975. Sex determination in bees IV. Genetic control of juvenile hormone production in *Melipona quadrifasciata* (Apidae). *Genetics*, 81: 749-756.

- Krebs, C. J. 2001. Ecology. Benjamin Cummings Press, Fifth Edition, San Francisco, 695p
- Lazzari, S.M.N., Ceruti, F.C., Rodriguez-Fernandez, J.I., Opit, G. & Lazzari, F.A. (2010) Intra and interspecific variation assessment in Psocoptera using near spectroscopy. *Julius-Kühn-Archiv*, 425, 139–144.
- Lockey, K. H. 1991. Insect hydrocarbon classes: implications for chemotaxonomy. *Insect Biochemistry* 21, 91-97
- Michener, C.D. 1974. The social behavior of the bees. Cambridge: Belknap Press. 404p.
- Michener, C.D. 1979. Biogeography of the bees. *Ann. of Missouri Bot. Gard.* 68: 301- 323.
- Michener, C.D. 2000. *Bees of the world*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London. 927pp.
- Michener, C.D. 2007. *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, USA. 953 pp.
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., Davies, T.. 2002. A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification. *NIR Publications*.
- Newey, P.S., Robson, S.K.A. & Crozier, R.H. (2008) Near-infrared spectroscopy identifies the colony and nest of origin of weaver ants, *Oecophylla smaragdina*. *Insectes Sociaux*, 55, 171–175.
- Nunes-Silva, P., Gonçalves, L.S., Franco, T. M., Jong, D. 2006. Rate of Growth and development time of africanized honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers during ontogenetic development. *Braz. J. morphol. Sci.* 23(3-4), 325-332
- Nunes-Silva, C.G. 2008. *Mecanismo molecular da determinação de sexo e casta em Melipona compressipes (Hymenoptera: Apidae)*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Manaus, AM, Brasil. 59 pp.

- Oliveira, L. M., Cunha, J. A. 2005. Abelhas Africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na Floresta Amazônia? *Acta Amazonica*, VOL. 35, n 3, p. 389 – 394.
- Pasquini, C. 2003. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 14 (2): 198-219.
- Perkins, W. D.. 1986. Fourier Transform-Infrared Spectroscopy – Instrumentation. *Journal Chemometrics*. pp. A5-A10.
- Rafael, José Albertino; Melo, Gabriel A.R.; Carvalho, Claudio J.B. de; Casari, Sônia A.; Constantino, Reginaldo. 2012. *Insetos do Brasil*. 810pp. Capítulo “Hymenoptera Linnaeus, 1758. P.554-612.
- Ramos, J. M., Carvalho, N. C. 2007. Estudo Morfológico e Biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. *REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE ENGENHARIA FLORESTAL - ISSN 1678-3867. ANO VI, NÚMERO, 10*
- Rocha, M. P.; Pompolo, S. das G.; Fernandes, A.; Campos, L. A. de O. 2007. *Melipona* – Seis Décadas De Citogenética. *Biosci. J., Uberlândia*, v. 23, Supplement 1, p. 111-117
- Rodríguez-Fernández, J. I.; Carvalho, C. J. B.; Pasquini, C.; Lima, K. M. G.; Moura, M. O.; Arízaga, G. G. C. 2011. Barcoding without DNA? Species identification using near infrared spectroscopy. *Zootaxa* 2933: 46–54.
- Roubik, D.W. 1989. *Ecology and natural history of tropical bees*. London: Cambridge University Press. 514p.
- Saboya, N. P. 2002. Análisis de control de preparados farmacêuticos mediante espectroscopia em el infrarrojo próximo. Tese de doutorado, Universidad Autónoma de Barcelona. Belterra (Barcelona) Spain, 12p.
- Seeley, T.D. 1982. Adaptive significance of the age polyethism Schedule in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 11, 287-293.

- Siesler, H., W., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H., M.. 2002. Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications. *Wiley-VCH*.
- Silva, S.J.R. 2005. Fontes de pólen, pólem tóxico e mel amargo para três subespécies de abelhas *Apis mellifera* L. (africanas, italianas e cármicas) na Amazônia setentrional, Brasil. Tese de doutorado. PPBTRN-INPA/UFAM. 159p.
- Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. 1994. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Quinta edição. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro.
- Sledge, M. F.; Boscaro, F.; Turillazzi, S. 2001. Cuticular hydrocarbons and reproductive status in the social wasp *Polistes dominatus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 49, 401-409.
- Snodgrass, R. E. 1956. Anatomy of the honey bee. Cornell University Press; Ithica, USA. 334 pp. ISBN 1-904846-05-X
- Sousa L.C., Gomide J.L., Milagres F.R., Almeida D.P. 2011. Desenvolvimento de modelos de calibração NIRS para minimização das análises de madeiras de *Eucalyptus* spp. Santa Maria, RS. *Ciência Florestal*, 21:591-599.
- Stuart, B. 2004. Infrared spectroscopy: Fundamentals na Aplications. John Wiley & Sons, Ltd.
- Torres, E. C. de M.; Zilse, G. A.; Silva, C. G. N. 2010. Análise Comparativa, *In Silico*, de transcritos correlacionados à determinação de sexo em abelhas sem ferrão da Amazônia com Genoma *Apis mellifera*. XIX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA - CNPq/FAPEAM.
- Wilson, E. O. & Hölldobler, B. 2005. Eusociality: origin and consequences. *PNAS*, 102 (38): 13367-13371.
- Wing, S. L. & Boucher; L. D. 1998. Ecological aspects of the Cretaceous flowering plant radiation. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 26: 379-421.