

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Fisiologia da Digestão do Pólen na abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*  
Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Isabel Marques Rodrigues Amaral

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de Uberlândia, para a  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Uberlândia - MG  
Junho - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Fisiologia da Digestão do Pólen na abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*  
Latreille 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Isabel Marques Rodrigues Amaral

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de Uberlândia, para a  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Uberlândia - MG  
Junho - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Fisiologia da Digestão do Pólen na abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*  
Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Isabel Marques Rodrigues Amaral

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de Uberlândia, para a  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Uberlândia - MG  
Junho – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Fisiologia da Digestão do Pólen na abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*  
Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Isabel Marques Rodrigues Amaral

Profª. Drª. Ana Maria Bonetti  
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas em \_\_/\_\_/\_\_.

Profª. Drª. Vera Lúcia de Campos Brites

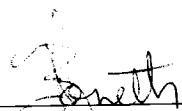
Uberlândia - MG  
Junho - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

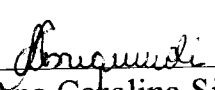
Fisiologia da Digestão do Pólen na abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*  
Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Isabel Marques Rodrigues Amaral

Aprovado pela Banca Examinadora em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Nota: \_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Bonetti

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Ueira Vieira

  
\_\_\_\_\_  
Ms. Ana Carolina Silva Siquieroli

Uberlândia, 01 de Junho de 2007.

# Fisiologia da Digestão do Pólen na abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

## RESUMO

A importância do pólen para a colônia de abelhas é inquestionável, pois dele dependem o suprimento de proteínas, sais minerais e produtos biológicos especiais utilizados na alimentação. Nesse trabalho foi investigado o consumo e a digestão do pólen e, também, identificada a atividade de algumas enzimas, relacionadas com esse processo, no intestino médio de larvas, nutridoras, forrageiras e presentes nos potes de pólen, da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* Latreille, 1811. As abelhas foram coletadas e identificadas de acordo com o desenvolvimento ontogenético: larva pré-defecante (LPD), nutridoras (N) e forrageiras (F). Intestino médio de LPD (n=10), e o intestino médio e reto de N e F (n=10) foram dissecados e a análise foi feita utilizando um microscópio óptico (Nikon) com aumento de 200x. Nos grãos de pólen foram identificadas características como opacidade e transparência. A análise enzimática foi realizada utilizando o Kit Api Zym (Bio Mérieux). Os resultados mostraram que os grãos de pólen são, praticamente, ausentes em forrageiras. Em relação às larvas pré-defecantes e nutridoras a quantidade de grãos de pólen varia no intestino médio e no reto. Dezesete enzimas analisadas pelo kit Api Zym foram detectadas no intestino médio de *M. scutellaris* com diferentes concentrações entre as fases analisadas.

Palavras-chaves: *Melipona scutellaris*, pólen, Api Zym, enzimas.

## INTRODUÇÃO

Dentre os vários agentes polinizadores, os insetos apresentam, para a maioria das plantas, maior eficiência tanto pelo seu número na natureza quanto por sua melhor adaptação às complexas estruturas florais (Nogueira-Couto et al., 1990). Estudar os recursos florais utilizados pelas abelhas é de grande importância para manutenção e preservação das mesmas, especialmente, em habitats urbanos (Zanette et al., 2004). Sabe-se que elas alimentam-se do néctar e pólen que retiram das flores levando-os para a colônia e armazenando em potes (Castro et al., 1990; Corbet et al., 1991).

A importância do pólen para a colônia é inquestionável, pois dele dependem o suprimento de proteínas, sais minerais e produtos biológicos especiais, utilizados na alimentação (Marchini et al., 2006). Operárias requerem uma dieta rica em proteína (pólen) para completo desenvolvimento, bem como as recém nascidas e as que estão trabalhando dentro da colônia. Por outro lado, operárias velhas, ditas forrageiras, trabalham fora da colônia na busca de alimentos, necessitam de uma dieta rica em energia e por isso preferindo néctar ou mel, que contêm grande quantidade de açúcar (Zerbo e Silva de Moraes, 1996).

As abelhas necessitam de dez aminoácidos essenciais: arginina, histidina, lisina, triptofano, felinamina, metionina, treonina, leucina, isoleucina e vanila, os quais são obtidos do pólen. O pólen é a principal fonte de proteínas e lipídios para as larvas, já que, a quantidade de proteína e lipídios presente no néctar é insignificante (Haydak, 1970). As larvas também ingerem secreções glandulares produzidas pelas nutridoras (Zerbo e Silva de Moraes, 1996) e a rainha fisogástrica, além de receber essa dieta, ingere ovos tróficos (Sakagami e Zucchi, 1963) os quais são postos pelas operárias, geralmente sobre o favo ou nas bordas da célula de cria (Kerr, 1948).

A composição do pólen varia entre as espécies de plantas, além de sofrer a influência da idade, da condição nutricional da planta e das condições ambientais durante o desenvolvimento do pólen (Herbert Jr. e Shimanuki, 1978). Contém basicamente 30% de água, 10 a 36% de proteínas, 20 a 40% de glicídios, 1 a 20% de lipídios (gorduras) (mas, usualmente, não mais que 5%), 1 a 7% de minerais (cálcio, cloro, cobre, ferro, magnésio, fósforo, potássio, silício, enxofre, alumínio, ferro, manganês, níquel, titânio e

zinco), além de resinas, corantes, vitaminas A, B, C, D, E, enzimas e coenzimas (Prost, 1985).

Nesse trabalho foi investigado o consumo e a digestão do pólen e, também, identificada a atividade de algumas enzimas, relacionadas com o processo da digestão do mesmo, no intestino médio de larvas, nutridoras, forrageiras e presentes nos potes de pólen da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* Latreille, 1811.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Biológico

O material biológico utilizado nesse trabalho foi a abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* coletada no Meliponário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

As abelhas foram coletadas e identificadas de acordo com o desenvolvimento ontogenético: larva pré-defecante (LPD), são as larvas que já comeram todo alimento, não defecaram e ainda não abriram a abertura do intestino médio para o intestino posterior. Foram consideradas como nutridoras (N) as abelhas que estavam provisionando a célula de cria com o alimento. As forrageiras ou forrageiras (F) foram coletadas saindo ou retornando para a colônia.

### Quantificação e classificação dos grãos de pólen no trato digestório

Intestino médio de LPD (n=10) e o intestino médio e reto de N (n=10) (Hrassnigg e Crailsheim, 1997) foram dissecados, colocados em tubos eppendorf, aberto para a exposição do conteúdo intestinal e em seguida adicionado solução PBS (NaCl 130 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  28mM, pH 7,5). Dessa mistura 10 $\mu\text{L}$  foram colocados em lâmina coberta com lamínula para análise do pólen, sendo que o número de grãos de pólen digeridos e não digeridos foram contados e multiplicados pelo fator de diluição. Intestino médio e reto de F (n= 10) foram dissecados e cortados em lâmina, coberto com lamínula e em seguida foram analisados em microscopia de luz e feita a contagem dos grãos.



Nos grãos de pólen foram identificadas características como opacidade e transparência. A análise foi feita em todos os campos da lamínula, utilizando um microscópio óptico (Nikon) com aumento de 200x.

Grãos opacos foram considerados não digeridos porque apresentam todo seu conteúdo. Grãos transparentes foram considerados digeridos, resultado da completa digestão de seu conteúdo. Grãos com aspecto transparente e intermediário foram considerados como digeridos (Costa e Cruz-Landim, 2005).

A média do número de grãos de pólen, de acordo com cada aspecto, foi calculada por grupo de indivíduos (LPD, N, F) e o total de grãos no trato digestório foi obtido pela somatória de grãos digeridos com não digeridos. A variação do número total de grãos de pólen, no intestino médio e reto, foi estabelecida com o teste Kruskal-Wallis (ANOVA). Para determinar diferenças estatísticas entre os grupos de indivíduos, o teste de Dunn foi aplicado a posteriori.

### **Dosagem enzimática**

Dez intestinos médios de LPD, N, F foram dissecados, macerados e centrifugados a 12000 g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado água destilada para um volume final de 1,5 mL. Nesse experimento foi utilizada ainda, uma solução de 200 µL de pólen: 100mg de pólen retirados de um pote lacrado foram misturados e agitados em micro tubos com 200 µL de PBS, centrifugado por 10 min a 12000 g e o sobrenadante coletado para a dosagem enzimática.

Em seguida a amostra foi adicionada em cada pocinho do Kit Api Zym (Bio Mérieux). As reações foram realizadas segundo recomendações do fabricante.

Esse kit consiste de uma galeria de 20 pocinhos, cada um com substrato para diferentes enzimas. O resultado da reação enzima-substrato é um produto colorido. A intensidade de cor é diretamente proporcional à hidrólise do substrato. Os valores (em nmol) de enzimas são dados pela comparação com a tabela fornecida pelo fabricante.

## RESULTADOS

### Quantificação e classificação dos grãos de pólen no trato digestório

A Figura 1 ilustra os grãos de pólen digeridos e não digeridos. Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que o número de grãos de pólen foi muito baixo em forrageiras. Em relação à larva pré-defecante e nutridoras os números de diferentes tipos de grãos de pólen variam no intestino médio e no reto.

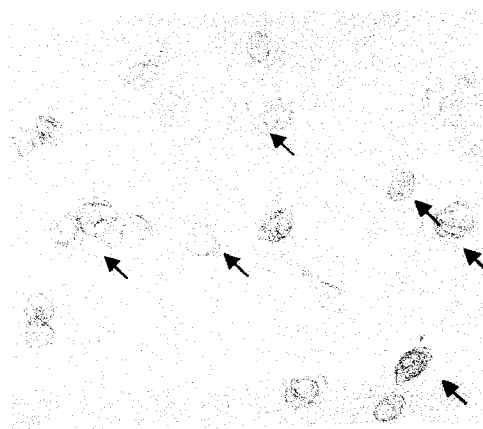


Figura 1: Pólen não digerido (seta preta) e pólen digerido (seta vermelha) presente intestino médio de larva pré-defecante (LPD).

Tabela 1: Média e desvio padrão dos números de grão de pólen digerido, não digerido e total do intestino médio e reto em diferentes fases de *M. scutellaris*.

Grupo	Intestino médio			Reto		
	Digerido	Não digerido	Total	Digerido	Não digerido	Total
L	18480000 ± 683549,6	3170000 ± 170948,34	21650000 ± 793337	276850 ± 9855,9	10100 ± 754,1	288750 ± 10531,1
N	184400 ± 8862,3	16750 ± 708,3	201150 ± 9361,8	68 ± 2,5	27 ± 1,8	95 ± 4,3
F	272 ± 13,9	63 ± 3,7	335 ± 17,7			

O total de grãos de pólen no intestino médio de larva é significativamente maior ( $p < 0.05$ ) do que em operárias nutridoras e forrageiras.

O número de grãos digeridos no intestino médio de larva é significativamente maior ( $p < 0.05$ ) que em nutridoras.

O número de grãos digeridos no reto de nutridoras é significativamente maior ( $p < 0.05$ ) do que o digerido em forrageiras.

### Atividade Enzimática

Dezessete enzimas analisadas pelo kit Api Zym foram detectadas no intestino médio e potes de pólen de *M. scutellaris* com diferentes concentrações entre as fases de desenvolvimento analisadas. As enzimas lipase (C14) e  $\beta$ -glicosidase (Tabela 2) não apresentaram atividade.

Tabela 2: Atividade enzimática (em nmol de substrato digerido) de extratos do intestino de *Melipona scutellaris* em diferentes idades, testada pelo Kit Api Zym.

Enzima	Fase de desenvolvimento			
	LPD	N	F	Pólen
Fosfatase alcalina	30	30	$\geq 40$	10
Esterase (C4)	0	10	10	0-5
Esterase Lipase (C8)	0	30	30	5
Lipase (C14)	0	0	0	0
Leucina arilamidase	10	$\geq 40$	$\geq 40$	0
Valina arilamidase	10	$\geq 40$	30	0
Cistina arilamidase	0	10	5	0
Tripsina	10	30	10	0
$\alpha$ -quimotripsina	10	5	2	0
Fosfatase ácida	10	30	$\geq 40$	10
Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	30	30	$\geq 40$	10
$\alpha$ -galactosidase	0-5	0	0	10
$\beta$ -galactosidase	5	10	10	30
$\beta$ -glicosidase	0	0	0	0
$\alpha$ -glicosidase	0-5	$\geq 40$	$\geq 40$	0-5
$\beta$ -glicosidase	0-5	10	10	0-5
N-acetil- $\beta$ -Glicosaminidase	30	$\geq 40$	$\geq 40$	0
$\alpha$ -manosidase	0-5	5	5	0
$\alpha$ -fucosidase	10	5	5	0

## DISCUSSÃO

Os hábitos alimentares das abelhas correlacionam-se com a idade, conseqüentemente, com a divisão do trabalho (Blanchard et al., 2000). As larvas de *M.*

*scutellaris* ingerem uma grande quantidade de pólen. Esse fica acumulado no intestino médio durante o estágio larval até que ocorra a abertura do intestino médio para o intestino posterior no estágio de pré-pupa, quando inicia o processo de defecação (Snodgrass, 1956; Cruz-Landim e Mello, 1981). As nutridoras de *M. scutellaris* ingerem uma grande quantidade de pólen, contudo, significativamente inferior ao ingerido pelas larvas (Crailsheim, 1992; Crailsheim et al., 1992). O número de grão de pólen digerido junto com atividade enzimática sugere que esses indivíduos requerem proteínas na sua dieta.

As forrageiras trabalham fora da colônia na busca de alimentos, necessitando de uma dieta rica em energia, preferindo néctar ou mel, que são abundantes em açúcares (Zerbo e Silva de Moraes, 1996). Neste trabalho, a contagem de grãos de pólen no intestino médio e no reto de forrageiras afirmou a baixa quantidade de pólen ingerida por essas abelhas.

Dentre as dezenove enzimas detectadas no teste de atividade enzimática está as glicosidades que hidrolisam açúcares como: celobiose, hemicelulose, gentianose e glicoproteínas (Terra et al., 1996). Essas enzimas apresentaram atividade nas nutridoras e forrageiras de *M. scutellaris*. Esses resultados também foram obtidos por Arnold e Delage-Darchen (1978), Delage-Darchen et al. (1979, 1982), Delage-Darchen e Darchen (1982) e Toth e Robinson (2005) em *Apis mellifera*, confirmando a maior necessidade de consumo de alimentos energéticos (mel e néctar) pelas forrageiras.

As enzimas N-acetil- $\beta$ -Glicosaminidase,  $\alpha$ -fucosidase,  $\alpha$ -manosidase estão relacionadas à digestão de polissacarídeos. Em *Apis mellifera*, o vôo para coleta de pólen dura em torno de dez minutos, enquanto que para coletar néctar as forrageiras gastam entre 30 a 80 minutos (Winston, 1987). Se as forrageiras obtêm energia ingerindo néctar e mel na colônia mais uma parte do que foi coletado para retornar à colméia, é provável que elas sustentem o vôo consumindo principalmente carboidratos (Toth e Robinson, 2005). A necessidade de uma dieta energética pode estar relacionada com atividade de forrageamento. As forrageiras precisam de energia para o vôo.

As nutridoras e forrageiras de *M. scutellaris* apresentaram elevada quantidade de esterase lipase. Isso foi observado em forrageiras de *Scaptotrigona postica*, em que essa enzima estava presente em quantidade maior ou igual a 40 nmol (Costa e Cruz-Landim, 2005). As abelhas utilizam os lipídeos florais na alimentação e na construção da colméia (Roubik, 1992).

As elevadas taxas de tripsina e  $\alpha$ -quimotripsina observadas em larvas pré-defecantes e nutridoras ocorrem devido ao alto metabolismo de proteínas (Crailsheim, 1986), visto que, elas ingerem uma quantidade significativa de pólen. As larvas necessitam de uma alta demanda protéica para o completo desenvolvimento, enquanto que as nutridoras utilizam uma grande quantidade de proteína para fabricação do alimento larval.

As arilamidases catalizam a conversão das proteínas em aminoácidos e apresentaram alta atividade no intestino médio de nutridoras e forrageiras de *M. scutellaris*. Dentre os aminoácidos, a leucina possui grande importância, pois é um dos dez aminoácidos essenciais para o crescimento de abelhas jovens (Groot, 1953). Assim, o metabolismo protéico é rápido em abelhas jovens, demandando grande quantidade de leucina arilamidase (Costa e Cruz-Landim, 2005). Apesar de forrageiras praticamente não se alimentarem de pólen, elas podem consumir proteínas pelo processo de trofalaxia, diminuindo o peso tornando-as mais aptas para o vôo (Vieira, 2007).

Os altos níveis da atividade da fosfatase ácida em nutridoras e forrageiras de *M. scutellaris* podem ser devido à presença dessas enzimas no suco digestivo ou na própria comida, constituída, principalmente, por grãos de pólen ou da flora bacteriana do intestino (Cavalcante e Cruz-Landim, 2004). As fosfatases, também, estão relacionadas com o metabolismo intracelular (Colin et al., 2002). Uma situação similar pode ocorrer com a naftol-AS-BI-fosfohidrolase, visto que é uma fosfatase e seu perfil de atividade é o mesmo da fosfatase ácida. Fato semelhante é observado em *Melipona seminigra* (Vieira, 2007).

Foi encontrada uma alta atividade da enzima  $\beta$ -galactosidade no pólen de *M. scutellaris*, provavelmente secretada pelas glândulas hipofaringeanas. Segundo Crane (1987), a adição de enzimas pelas abelhas ao néctar irá causar mudanças químicas, que irão aumentar a quantidade de açúcar, o que não seria possível sem essa ação enzimática (Schepartz e Subers, 1966; White e Kushinir, 1967; Huidobro et al., 1995). Segundo Vieira (2007) não existe atividade dessa enzima no pólen de *M. seminigra*. O alimento larval também apresenta uma alta atividade da  $\beta$ -galactosidade (Menezes, 2006). Esse dado sugere que *M. scutellaris* secretam enzimas para uma pré-digestão do pólen, podendo dessa forma fornecer um alimento menos complexo às larvas.

Os dados do trabalho de digestão do pólen estão restritos ao papel do intestino médio, e como foram encontrados poucos grãos não digeridos no reto, podemos concluir que em *M. scutellaris* o intestino médio tem papel essencial na secreção de enzimas digestivas, sendo órgão eficiente nesse processo.

Esse trabalho contribuiu com dados sobre as condições de vida das abelhas sem ferrão criadas no Meliponário de Uberlândia, já que, desde a vinda das mesmas para Uberlândia nenhum estudo neste sentido foi realizado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOLD G, DELAGE-DARCHEN B (1978) Nouvelles données sur l'équipement enzymatique des glandes salivaires de l'ouvrière d'*Apis mellifica* (Hyménoptère, Apidé). Ann Sci Nat Zool Biol Anim 12: 401-422.
- BLANCHARD GB, ORLEDGE GM, REYNOLDS SE, FRANKS NR (2000) Division of labour and seasonality in the ant *Leptothorax albipennis*: worker corpulence and its influence on behaviour. Anim Behav 59: 723-738.
- CASTRO MS, VIANA BF (1990) A Uruçu do litoral baiano e nordestino - *Melipona scutellaris*. Revista Apicultura e Polinização 37: 34-35.
- CAVALCANTE VM, CRUZ-LANDIM C (2004) Electrophoretic protein pattern and acid phosphatase activity in the midgut extracts of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) during metamorphosis. Neotrop Entomol 33: 169-172.
- COLIN M, TCHAMITCHIAN M, BONMATIN JM, PASQUALE S (2002) Presence of chitinase in adult *Varroa destructor*, an ectoparasitic mite of *Apis mellifera*. Exp Appl Acarol 25: 947-955.
- CORBET SA, WILLIAMS IH, OSBORNE JL (1991) Bees and pollination of crops and wild flowers in the european community . Bee World, Buckinghamshire 720: 47-59.
- COSTA RAC, CRUZ-LANDIM C (2005) Hydrolases in the hypopharyngeal glands of workers of *Scaptotrigona postica* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). Genet Mol Res 4: 616-223.
- CRAILSHEIM K (1986) Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifera carnica*). J Insect Physiol 32: 629-634.
- CRAILSHEIM K, (1992) The flow of jelly within a honeybee colony. J Comp Biol 162: 681-689.
- CRAILSHEIM K, SCHNEIDER LHW, HRASSNIGG N, BUHLMANN G, BROSCHE U, (1992) Pollen consumption and utilization in worker honey bee (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. J Insect Physiol 38: 409-419.
- CRANE E (1987) O livro do mel. Nobel São Paulo, pp: 226.

- CRUZ-LANDIM C, MELLO RA (1981) Desenvolvimento e envelhecimento de larvas e adultos de *Scaptotrigona postica* L. (Hymenoptera: Apidae): aspectos histológicos e histoquímicos. Aciesp, São Paulo.
- DELAGE-DARCHEN B, CONCONI JR, AGUILAR IC (1982) Comparaison entre l'équipement enzymatique des glandes salivaires et de l'intestin moyen de diverses espèces d'abeilles sociales. *Apidologie* 13: 265-273.
- DELAGE-DARCHEN B, DARCHEN R (1982) Les enzymes digestives des glandes salivaires et de l'intestin moyen d'une abeille sociale du Mexique, *Melipona beecheii* (B.). *Ann Sci Nat Zool Biol Anim* 4: 91-96.
- DELAGE-DARCHEN B, TALEC S, DARCHEN R (1979) Sécrétion enzymatique des glandes salivaires et de l'intestin moyen d'une abeille sans dard *Apotrigona nebulata* (Sm.), (Hyménoptères, Apidés). *Ann Sci Nat Zool Biol Anim* 1: 261-267.
- GROO AP (1953) Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Physiol Comp Oecol* pp: 197-285.
- HAYDAK MH (1970) Honey bee nutrition. *Annu Rev Entomol* 15: 143-153.
- HRASSNIGG N, CRAILSHEIM K (1997) The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol* 44: 393-404.
- HERBERT JR, SHIMANUKI H (1978) Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie* 9: 33-40.
- HUIDOBRO JF, SANTANA FJ, SANCHES MP, SANCHO MT, MUNIATEGUI S, SIMAL-LOZANO J (1995) Diastase, invertase and  $\beta$ -glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain. *J Apic Res* 34: 39-44.
- KERR WE (1948) Estudos sobre o gênero *Melipona*. In anais da escola superior de agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP. Anais...Piracicaba: Universidade de São Paulo, 5:182-276.
- MARCHINI LC, REIS VDA, MORETI ACC (2006) Physico-chemical composition of pollen samples collected by africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). In Piracicaba Brazil, 36: 949-953.
- MENEZES C (2006) Determinação de castas no gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): influência do alimento larval. Monografia, 34f. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (MG).
- NOGUEIRA-COUTO RH, PEREIRA JMS, COUTO LA (1990) Estudo da polinização entomófila em *Cucúrbita pepo* (abóbora italiana). *Científica* 18: 21-27.
- PROST JP (1985) Apicultura. Ediciones Mundi-Prensa Espanha, 573:306-315.
- ROUBIK DW (1992) Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge University, Cambridge, UK.

- SAKAGAMI SF, ZUCCHI R (1963) Ovoposition process in a stingless bee, *Trigona* (*Scaptotrigona postica* Latreille). *Stud Entomol* 6: 497-510.
- SCHEPARTZ AI, SUBERS MH (1966) Catalase in honey. *J Apic Res* 5: 37-43.
- SNODGRASS RE (1956) *Anatomy of the Honey Bee*. Comstock Publishing Ass, NY.
- TERRA WR, FERREIRA C, JORDÃO BP AND DILLON BJ (1996). Digestive enzymes. In: *Biology of the insect midgut*. London: Chapman Hall pp: 3-25.
- TOTH AL, ROBINSON GE (2005) Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Anim Behav* 69: 427.
- VEIRA CU, (2007) Contribuições à neurobiologia e a fisiologia da digestão do pólen na abelha sem ferrão da Amazônia *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina). Relatório final de pós-doutorado. Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia.
- WHITE JW, KUSHNIR I (1967) The enzymes of honey: examination by ion-exchange chromatography, gel filtration, and starch-gel electrophoresis. *J Apic Res* 6: 69-89.
- WINSTON ML (1987) *The biology of the honey bee*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- ZANETTE L, MARTINS RP, RIBEIRO SP (2004) Effects of urbanization on Neotropical wasps and bees assemblages. *Land and Urban Plan* 71: 105-121.
- ZEBO AC, MORAES RLMS (1996) Avaliação do tipo de digestão e do grau de aproveitamento dos grãos de pólen ingeridos por larvas e adultos de *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). II Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto, Anais (281).



## **Anexo**

### **Normas da Revista Biological Research**

#### **Forma e preparação de manuscritos**

##### **INFORMAÇÃO GERAL**

Para acelerar o processo, a revisão e o processo editorial, os autores deverão seguir cuidadosamente as seguintes instruções.

Recomenda-se o envio por e-mail dos manuscritos, devido a alta velocidade e exatidão dos processos de revisão da publicação. O texto do manuscrito deverá ser enviado somente em um arquivo (formato pdf). O sobrenome do autor correspondente, deverá aparecer como nome do arquivo (por exemplo: Silva.pdf). As figuras deverão ser enviadas separadamente em formato pdf, png ou jpg. Cada figura deverá ser enviada em um arquivo separado e o nome dos arquivos deverá incluir o sobrenome do autor correspondente assim como o número da figura correspondente (por exemplo: Silva\_Fig1.png). Os arquivos deverão ser enviados em anexo ao e-mail do editor (veja abaixo). O envio de manuscritos em outros formatos deverá ser autorizado antes de serem enviados, contactando o Editor assistente de produção, Laura Olguin (telefone: (56-2) 6618003, e-mail: lolguin@unab.cl).

O manuscrito deve estar acompanhado por uma carta de intenção do autor, quem será responsável pela correspondência com relação ao manuscrito, e com os potenciais revisores.

O arquivo enviado deve também incluir uma declaração jurada que contenha o título do manuscrito, o número de figuras associadas ao manuscrito, e uma afirmação que:

1. todos os dados do manuscrito são exatos e todas as declarações consideradas fatos são baseadas em uma cuidadosa pesquisa realizada pelo(s) autor(es);
2. todos os autores nomeados participaram no trabalho de forma substantiva e estão preparados para tomar a responsabilidade pública do trabalho;

3. o manuscrito que é enviado a esta revista nunca foi, com exceção de publicações em resumos de conferencias ou tese, publicado em sua totalidade ou em parte, e não está sendo enviado a publicar em outra parte.

Esta declaração deve ser assinada e datada por cada um dos autores, acompanhada por seus nomes, claramente escritos. Os autores de diferentes países ou instituições podem assinar diferentes copias da mesma declaração.

Por favor, proporcione os nomes e endereços de pesquisadores de reconhecida capacidade na área de pesquisa do seu manuscrito, que possam ser considerados como possíveis revisores.

Serão considerados para publicação, manuscritos de qualquer país, com preferência os que estiverem escritos em inglês. Preferivelmente pontuação e ortografia norte americana. Não separe as palavras no final de uma linha. Deve-se evitar o uso de neologismos e terminologia técnica não padronizada.

Os manuscritos devem ser digitalizados com espaço duplo em todas partes, deixando margens de 2,5 centímetros (1 polegada) em todos os lados. Aconselhamos aos autores guardar cópias de todos os trabalhos enviados, já que a oficina editorial não se responsabiliza pelos danos ou perdas. As abreviações e símbolos devem raramente ser utilizados, e quando utilizados, devem ser definidos quando mencionados. Padronize as abreviações e símbolos em todo texto, tabelas e ilustrações. Os caracteres especiais e as palavras que não fazem parte do inglês devem estar escritos em itálico.

## **PARTES DO MANUSCRITO**

### **1. PÁGINA DO TÍTULO**

1a) Título do trabalho (em letras minúsculas). O título deve ser conciso, mas informativo, já que é frequentemente utilizado como índice. Não deve possuir abreviações ou fórmulas químicas.

1b) Nomes dos autores (em letras maiúsculas). Todos os autores listados devem ter participado diretamente e substancialmente no estudo divulgado. Os autores devem ser

listados pelo primeiro nome completo, a inicial do segundo nome ou sobrenome, e o sobrenome completo (ex.: JOÃO C. SILVA).

1c) Instituição(ões) no qual a pesquisa foi realizada (laboratório, departamento, instituto, faculdade, universidade, cidade, estado país). Quando os autores estão afiliados a diferentes departamentos ou instituições, utilize números em sobrescrito depois do apelido de cada autor e antes do departamento ou instituição correspondente.

1d) Autor Correspondente. Indique o nome completo do autor a quem a correspondência deve ser enviada, endereço completo para ser enviado por correio (Não traduza o endereço da correspondência!), o e-mail e os números de telefone e do fax.

1e) Quando o endereço atual do autor é diferente do endereço da instituição (ou instituições) no qual foi realizado o trabalho, deve estar incluído uma nota ao pé da página, identificando o autor e a nota com um asterisco.

## **2. RESUMO**

Um parágrafo simples que excede 200 palavras, digitado em página separada, deve indicar clara e concisamente o propósito da pesquisa, os procedimentos básicos, os resultados principais e as conclusões principais. Deve ser compreensível para alguém que não leu o texto. Evite o uso de abreviações e de termos altamente especializados no resumo.

**TERMOS CHAVES.** Selecione 3 a 6 palavras-chave para permitir que o manuscrito seja colocado em um índice apropriadamente. Estas palavras devem aparecer debaixo do resumo, na mesma página. Deve ser listado alfabeticamente em letras minúsculas. Pode ser utilizado palavras simples ou compostas (ex.: fator de transcrição, anticorpos monoclonal, meiose, crista neural, células germinativas).

## **3. TEXTO**

Esta parte do manuscrito deve começar em uma nova página. O corpo do artigo se dividirá em seções, como indicado abaixo (3a-3e). Os títulos das seções devem estar

centralizados e digitados com letras maiúsculas. As linhas em branco devem ser utilizadas antes e depois dos títulos e depois dos subtítulos, mas NUNCA entre os parágrafos da mesma seção. Não justificar a margem direita. Podem ser utilizadas subseções para uma melhor organização e apresentação dos Métodos, Resultados e Discussão. Os subtítulos devem estar escritos em letras minúsculas e itálicas iniciando no princípio da margem esquerda. Não realizar espaço no princípio dos parágrafos das seções ou subseções: inicie ambos na margem esquerda. Os parágrafos seguintes devem iniciar com 5 espaços da margem esquerda.

3a) **INTRODUÇÃO**. Esta seção deve conter o propósito do artigo sem uma revisão extensa do tema e utilizando apenas as referências mais pertinentes. Indique as razões que motivaram a pesquisa e as hipóteses a serem testadas quando apropriado.

3b) **MÉTODOS**. Descreva os procedimentos utilizados em forma breve mas com suficiente detalhe para que os outros pesquisadores possam reproduzir os resultados.

O desenho do experimento deve indicar o número de amostras envolvidas no estudo e o número de medidas que originarão os valores mencionados. Indique caso as medidas foram realizadas em diferentes objetos ou repetidamente no mesmo.

Nos estudos que utilizam humanos, os autores devem afirmar que seu trabalho foi realizado de acordo com os princípios expressados na Declaração de Helsinki. Os autores devem também incluir uma declaração afirmando que os experimentos foram realizados com o conhecimento do objeto de estudo, ou parente, ou responsável quando se trata de uma criança menor de idade como objeto de estudo.

Os estudos que utilizam animais em seus experimentos devem ser realizados de acordo com os Princípios Orientados no Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, aprovado pela American Physiological Society. A proveniência dos animais utilizados nos experimentos deve ser mencionada e, exceto no caso de animais de uso comum de laboratório, as referências devem incluir seus nomes científicos binomiais em latim e itálico. Devem também estar incluído os nomes binomiais latinos das plantas e microorganismos, assim como suas variações e fontes. Para os experimentos na área da genética bacteriana, devem seguir as recomendações de Demerec et al., *Genetics* (1966) 54: 61-76.

Os equipamentos de uso comum devem ser identificados genericamente. Entretanto, quando se utilize um equipamento especial que poderia ter um efeito no

resultado obtido, o fabricante deve estar identificado, assim como o número de série e lugar de origem.

Para a nomenclatura química, deve seguir as convenções adotadas pela Sociedade de Bioquímica (veja *Biochem J* 209:1-27, 1983).

As drogas devem estar identificadas pelo nome genérico (em letra minúscula). Caso seja necessário proporcionar marcas e fontes, devem estar escritas entre parênteses. As enzimas devem estar identificadas quando mencionadas por primeira vez, segundo a Enzyme Commissions (EC) da International Union of Biochemistry.

A seção de Métodos deve incluir informação precisa sobre as Análises Estatísticas realizadas. Indique a forma em que os resultados se encontram expressados (Medias aritméticas, Desvio padrão ou Erro padrão da média ou mediana e intervalos de confiança), caso seja uma prova paramétrica (chi-quadrado, teste t de Student, ANOVA) ou não paramétrica (Wilcoxon, Kruskal-Wallis, Friedman, Quade, Kolmogorov-Smirnoff) e os coeficientes de correlação (de Pearson ou Spearman) que foram utilizados, etc.

3c) RESULTADOS. Os resultados devem estar descritos nesta seção sem discursão dos seus significados. Demonstre ao leitor de forma clara e exatamente quais foram os seus resultados. Tente quantificar quando seja possível. Os valores decimais devem estar limitados a 3 posições decimais e indicados com um ponto em vez de vírgula, como é o caso em espanhol (ex.:  $p < 0.001$ ). A notação algébrica se recomenda para valores menores (ex.:  $p = 7 \pm 10^{-5}$ ). Números grandes (mil, milhões, etc.) devem estar separados cada três posições por vírgula (nunca pontos, como em espanhol).

Proporcionar informação sobre a variabilidade e a significância estatística dos dados apresentados. Os valores de média devem ser acompanhados de desvios padrões ou erros padrões da média, mas nunca ambos. Indique quais as análises estatísticas e o número de observações utilizado em cada uma delas. Os números estatísticos relacionadas a uma mesma variável (ex.: média e erro padrão da média) devem ser expressos com o mesmo número de posições decimais.

Os dados em Tabelas ou em Figuras (ver abaixo) podem ser expressos quando seja estritamente necessário, mas os mesmos dados não devem ser apresentados de ambas as formas. Não repetir no Texto todos os dados que aparecem nas Tabelas e nas Ilustrações.

3d) **DISCUSSÃO.** Esta seção deve ser concisa e requer enfatizar tanto os novos e importantes aspectos do estudo assim como as conclusões destes.

A discussão deve focar a interpretação dos resultados obtidos. Deve ser enfatizado o significado biológico dos efeitos que são estatisticamente significativos. Indique se os resultados obtidos proporcionam uma resposta a suas perguntas ou apóiam a hipótese apresentada na Introdução.

Discussão das observações prévias devem estar relacionadas com os resultados atuais assim como as especulações. Os resultados negativos também podem aportar conclusões úteis e merecem por isso serem publicadas, desde que obtidos através de experimentos que foram cuidadosamente desenhados e realizados.

3e) **RECONHECIMENTOS.** Especifique financiamentos econômicos. Mencione somente aquelas pessoas que contribuíram substancialmente ao estudo desde que estejam de acordo de serem nomeados.

#### **4. REFERÊNCIAS**

As referencias devem estar organizadas alfabeticamente por sobrenome do autor. Caso tiver mais de uma referencia para um autor ou um grupo de autores, estas devem estar listadas em ordem cronológica, começando com a publicação mais antiga.

Nas referencias onde aparecem dois autores, com o mesmo primeiro autor, a ordem deve ser alfabética de acordo como o sobrenome do segundo autor. Quando três ou mais autores listados, a ordem será cronológica de acordo somente como o primeiro autor (sem considerar a ordem dos nomes dos seguintes autores), considerando que estas referencias serão citadas no texto somente pelo autor principal, seguido pela abreviação 'et al'.

Cada referencia deve incluir os sobrenomes e iniciais escritas totalmente em maiúscula de todos os autores. Não utilize apostrofes dentro do nome ou espaço entre as iniciais. (ex.: OBRIEN ou MCDONALD, e não O'BRIEN ou MC'DONALD). Os nomes de cada autor devem estar separados por vírgulas (ex.: DOE JJ, JONES SE, SMITH BW). Logo após os nomes deve vir escrito o ano de publicação entre parênteses, o título completo do artigo (com somente a primeira letra da primeira palavra em maiúsculo), o nome abreviado da revista (iniciais em maiúsculo, sem

pontuação), número do volume, dois pontos e número de páginas do artigo. Não inclua número das edições ou seções.

No caso dos capítulos de livro, escreva o nome dos editores (sobrenome e as iniciais do nome) em maiúscula seguido por "(ed)" ou "(eds)" em parênteses, o nome do livro, a cidade, dois pontos, a editora, a abreviação "pp" antes dos números da primeira e última páginas do capítulo pertinente. Evitar todos os espaços e vírgulas desnecessárias.

Exemplos:

EYZAGUIRRE C, KOYANO H (1965) Effects of hypoxia, hypercapnia, and pH on the chemoreceptor activity of the carotid body in vitro. *J Physiol*, London 178:385-409.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

REYES JG, SANTANDER M, MARTINEZ PL, ARCE R, BENOS DJ (1994) A fluorescence method to determine picomole amounts of Zn (II) in biological systems. *Biol Res* 27 (in Press).

ROGERS DW (1983) *BASEC Microcomputing and Biostatistics*. Clifton NJ: Humana Press. pp:105-174.

SIEGLBAUM SA, KOESTER J (1991) Ionic channels. In: KANDEL ER, CHWARTZ JH, JESSEL TM (eds) *Principles of Neural Science*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier. pp:66-79.

URETA T, MEDINA C, PRELLER A (1987) The evolution of hexokinases. *Arch Biol Med Exp* 20: 343-357.

As referências devem ser citadas no texto do manuscrito com o sobrenome do autor e o ano da publicação entre parênteses [ex.: Miller, 2001], ou como parte da frase [ex.: "... Molinero (2001) divulgou que..."]. Ao citar manuscritos de dois autores, escreva ambos sobrenomes (ex.: Eyzaguirre e Koyano, 1999). Os manuscritos com três ou mais autores devem ser citados pelo sobrenome do primeiro autor seguido da abreviação 'et al.' separada antes do ano por uma vírgula (ej.: Lowry et al., 2000).

Todas as referências no texto devem aparecer em uma lista de referências. Os autores serão responsáveis de verificar as referências com os documentos originais.

Os manuscritos que já foram aceitos para publicação, mas que ainda não foram publicados, devem estar incluídos em uma seção de Referências, indicando entre parênteses e depois o nome da revista que se encontra: "in Press". A informação

proveniente dos manuscritos enviados, mas que ainda não foram aceitos, devem ser citados somente no texto e entre parênteses, como 'unpublished observations', ou 'manuscript in preparation' ou 'personal communication'. O autor tem a responsabilidade de verificar este tipo de citação com respeito ao documento original e conseguir a aprovação dos autores do documento citado. Os editores se reservam o direito de pedir a autorização por escrito. Se o conteúdo dos trabalhos 'in press', enviados ou em preparação é essencial para o entendimento do trabalho atual, estes devem acompanhar o manuscrito em consideração.

## 5. TABELAS

Todas as tabelas devem ser numeradas consecutivamente com números romanos e devem ser entregues em páginas separadas.

Cada tabela deve incluir um pequeno título e a informação suficiente relativa ao experimento, como a finalidade de ser compreensível, sem referir ao texto. Os títulos das colunas devem expressar claramente seu conteúdo e suas unidades de medida. Os dados que se mantêm iguais não devem ser repetidos em cada linha da tabela, e sim devem aparecer como nota debaixo de cada tabela.

Damos preferência a valores de média e medidas de dispersão (desvio padrão, range) do que observações individuais, mas devem estar incluídos os números de indivíduos que contribuem para estas estatísticas. Os valores significativos das diferenças entre os valores tabelados podem ser indicados por asteriscos, especificando seus valores na nota das tabelas, junto com a prova de probabilidade utilizada (ex.: teste t de Student: \* $p < 0.005$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

## 6. LEGENDAS PARA AS ILUSTRAÇÕES / FIGURAS

As legendas devem ser digitalizadas em páginas separadas (uma por página). As figuras devem ser numeradas consecutivamente com números arábicos. Cada figura deve incluir um título e uma legenda explicativa que descreva os resultados detalhadamente para sua compreensão, sem mencionar o texto. Entretanto, não repita a informação geral que foi corretamente incorporada na seção dos Métodos. Não repita as conclusões que serão derivadas dos dados da figura, descrita na seção Resultados.

As ilustrações devem ser citadas no texto com a palavra "Figura", sem ser abreviada quando forma parte de uma frase. Mas quando aparece entre parênteses, deve



utilizar a abreviação '(Fig.)'. A localização preferida de cada figura deve ser indicada na margem esquerda do texto.

## 7. ILUSTRAÇÕES

O método preferido para o envio das ilustrações é o formato digitalizado e enviado em anexo por e-mail ou em um CD enviado com as cópias impressas do texto. As figuras devem ser enviadas separadamente em formato pdf, png ou jpg. Cada figura deve ser enviada em um arquivo separado e os nomes dos arquivos devem incluir o sobrenome do autor correspondente assim como o número da figura correspondente (como Silva\_Fig1.png). Alternativamente, podem ser fornecidos em papel não maior que 21 por 27 centímetros e apresentados como desenhos originais, como fotografias em gloss paper branco e preto, ou em papel high-gloss utilizando uma impressora laser. Os números e letras devem ser suficientemente grandes para permitir uma altura mínima de 1,5 milímetros depois da redução fotográfica para uma largura da coluna de 7 centímetros. Cada figura deve estar marcada no verso com o número, título do artigo, e nome dos autores.

Se a cópia digitalizada é enviada, o manuscrito deve estar acompanhado de pelo menos um grupo de ilustrações originais para confirmar a impressão. Cada cópia do manuscrito deve incluir xerox das ilustrações (originais, no caso de fotomicrografias).

Os histogramas compostos de diferentes barras (sólidas, abertas, pontuadas, sombreadas, listadas com linhas verticais, horizontais ou diagonais) devem estar explicados nas legendas, as quais devem indicar também se as linhas verticais superiores representam SDs ou SEMs. Se o número de observações é o mesmo para todos os grupos, pode-se indicar com um quadro ( $n=##$ ). No caso de diferentes números para os grupos, estes devem estar indicados na parte inferior e superior das barras. Para gráficos nos quais as curvas são ajustadas, as legendas devem indicar se a linha de tendência foi ajustada visualmente, calculada de uma determinada equação, ou construída por um programa de computador específico.

As fotomicrografias devem estar preparadas com letras, flechas ou asteriscos que contrastem com o fundo ou destacado com uma sombra contrastante, se necessário. As escalas de comprimentos nas fotomicrografias são preferidas que as indicações de ampliações nas legendas.

Os autores que desejam formatar suas fotomicrografias no tamanho final das reproduções, devem considerar que as figuras devem ter 7 cm de largura, no caso de uma coluna simples e 15 cm de largura em uma coluna dupla. A altura não deve superar os 22 cms, mas damos preferência as alturas inferiores para permitir a inserção das legendas debaixo das figuras. Os autores devem indicar, no verso das ilustrações, que estas devem ser reproduzidas um 100%.

Quando se utiliza ilustrações previamente publicadas, os autores devem obter autorização escrita de quem mantém os direitos de propriedade intelectual (o autor, revista, sociedade ou editorial), o qual deve ser entregue ao editor desta revista, junto com o manuscrito. O manuscrito deve incluir os créditos adequados na legenda da figura correspondente, como também mencionar na secção de Agradecimentos.