



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Biologia

Ciências Biológicas - Licenciatura

CAIQUE ROCHA RESENDE

**DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DE UM SONICADOR PARA SIMULAR
ABELHAS VIBRADORAS USANDO VIBROMETRIA LASER, IMAGENS DE ALTA
VELOCIDADE E ANÁLISES ACÚSTICAS**

UBERLÂNDIA - MG

2021



CAIQUE ROCHA RESENDE

**DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DE UM SONICADOR PARA SIMULAR
ABELHAS VIBRADORAS USANDO VIBROMETRIA LASER, IMAGENS DE ALTA
VELOCIDADE E ANÁLISES ACÚSTICAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Uberlândia para como
parte das exigências para a obtenção do título de
Licenciatura em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Lourenço Garcia de
Brito

UBERLÂNDIA - MG

2021

CAIQUE ROCHA RESENDE

**DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DE UM SONICADOR PARA SIMULAR
ABELHAS VIBRADORAS USANDO VIBROMETRIA LASER, IMAGENS DE ALTA
VELOCIDADE E ANÁLISES ACÚSTICAS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente (Orientador): _____

Prof. Dr. Vinicius Lourenço Garcia de Brito
Universidade Federal de Uberlândia

Examinadores: _____

Prof. Dr. Anselmo Nogueira
Universidade Federal do ABC

Dr. Carlos Eduardo Pereira Nunes
University of Stirling

Uberlândia, 26 de maio de 2021

Agradecimentos

Antes de mais nada gostaria de agradecer a oportunidade de ter recebido uma boa educação e poder cursar uma graduação em uma universidade federal, fato esse que devo imensamente aos meus pais, Idalmo e Gisela, que sempre cuidaram de mim com muito amor e me criaram com muito zelo. Agradeço imensamente a minha irmã Monique, por tantas e tantas coisas que nem consigo citar aqui... saiba que você é a pessoa mais importante da minha vida. À minha tia Marta, por todos os diálogos a respeito de faculdade e TCC e aos momentos de queijos e vinho. E claro à toda minha família no geral.

Agradeço também ao meu orientador e amigo, Prof. Vinicius, por todo o acolhimento e aprendizado que me deu. Praticamente toda minha formação mudou para melhor depois que começamos a trabalhar juntos. Muito obrigado por todas as oportunidades que você me trouxe e por sempre ter me tratado com muito respeito e carinho. Ao Mário e ao Coquinho, que me acolheram em Stirling, em um dos momentos mais incríveis da minha formação.

À música, por sempre ter sido meu refúgio e incentivo para continuar. Às baterias universitárias e ao samba, por cuidarem sempre da minha saúde mental e por me proporcionarem amizades importantíssimas. Hannah, Angelo, Arthur e Arthur, meu eterno time de criação. Thiago, que apesar de ser do lado do cheerleading, foi um dos pouquíssimos amigos que levei da minha turma de faculdade. À todos vocês, meu muito obrigado pelos momentos incríveis dentro e fora da UFU.

Aos meus amigos de BU, batuque torto, meus amigos de distribuidora, meus amigos de esporte eletrônico, vulgo RPA, agradeço os momentos de descontração e diversão. Aos grupos que participei durante a graduação que me renderam bons aprendizados. A toda a Incendiária, Biônica e UFUteria por ter marcado minha história nesses 5 anos.

Agradeço à minha companheira Bianca, por toda a ajuda, conselhos e companhia neste fim de ciclo. Até durante a pandemia você foi um abrigo para mim, mesmo em meio a tantas dificuldades. Serei sempre grato a você por me tirar da solidão e me trazer momentos felizes e aconchegantes.

Obrigado também à banca examinadora por terem aceitado fazer parte desse momento. Fico honrado com a participação de profissionais cujo trabalho eu tive a oportunidade de conhecer durante minha formação acadêmica. E por fim, agradeço ao NERP por ser um grupo incrível.

Resumo

As abelhas são reconhecidamente os polinizadores mais importantes das plantas com flores. Mais da metade das abelhas existentes possuem a capacidade de realizar um comportamento de vibração durante a visita às flores. Esse comportamento é fundamental para polinização de flores de pólen pois, na maioria das vezes, essas flores possuem anteras poricidas e a retirada de pólen acontece especificamente pela vibração dessas abelhas num processo conhecido como “buzz pollination”. Durante esse processo, as abelhas podem ajustar diferentes valores de duração, frequência e amplitude de vibração de acordo com suas características corporais e com as características das flores que visitam. Dessa forma, um equipamento portátil e capaz de simular o comportamento de vibração de abelhas tanto no laboratório quanto no campo é de fundamental importância para o desenvolvimento das pesquisas sobre “buzz pollination” e a reprodução das flores de pólen. Neste projeto, desenvolvemos um sistema artificial de vibração caseiro e barato baseado em um alto-falante com placa de metal vibratória que permite simular o comportamento de abelhas com diferentes tamanhos e propriedades de vibração. Nós descrevemos sua acurácia e precisão usando vibrometria óptica. Também comparamos as vibrações medidas por vibrometria óptica com as vibrações medidas por imagens de alta velocidade e análises acústicas clássicas. O equipamento apresentou alta precisão e acurácia em 89% das reproduções de frequências, porém o mesmo não aconteceu com a reprodução das amplitudes. Tanto os vídeos de alta velocidade quanto o microfone gravaram as vibrações e permitiram boas estimativas de frequência dominante e amplitude geradas pelo sonicador. Dessa forma, o sonicador, quando devidamente calibrado, permite uma boa reprodução de vibrações artificiais. Além disso, vídeos de alta velocidade são uma boa alternativa para se estimar os componentes de vibração (frequência e amplitude) das abelhas em campo e em laboratório.

Palavras chave: vibração, polinização, vibrometria, biomecânica, flor de pólen

Abstract

Bees are the most important pollinators of flowering plants. More than half of the existing bees have the ability to perform a vibrational behavior during their visit to the flowers. This behavior is fundamental for pollination of pollen flowers because these flowers bear poricidal anthers and pollen release occurs only by the vibration of these bees in a process known as "buzz pollination". During this process, bees can adjust different values of duration, frequency and amplitude of vibration according to their body traits as well as the traits of the flowers they visit. Thus, a portable device capable of simulating the vibration behavior of bees in both the laboratory and the field is fundamental for research development in "buzz pollination" and pollen flower reproduction. In this project, we developed a homemade and inexpensive artificial vibration system based on a speaker with a vibrating metal plate that allows us to simulate the behavior of bees with different sizes and vibration properties. We described its accuracy and precision using optical vibrometry. We also compared the vibrations measured by optical vibrometry with those measured by high-speed videos and classical acoustic analysis. The equipment presented high precision and accuracy in 89% of the reproductions of frequencies, however the same did not happen with the reproduction of the amplitudes. Both the high-speed videos and the microphone recorded the vibrations and allowed good estimates of the dominant frequency and amplitude generated by the sonicator. Thus, the sonicator, when properly calibrated, allows a good reproduction of artificial vibrations. In addition, high-speed videos are a good alternative to estimate the components of vibration (frequency and amplitude) of bees in the field and in the laboratory.

Keywords: vibration, pollination, vibrometry, biomechanics, pollen flower

Sumário

	Páginas
1. Introdução.....	7
2. Material e Métodos.....	10
2.1. Desenvolvimento do Sonicador.....	10
2.2. Montagem do Sistema.....	10
2.3. Vibrômetro.....	10
2.4. Câmera de Alta Velocidade.....	11
2.5. Microfone e Gravador.....	11
2.6 Geração e Gravação das Vibrações.....	11
2.7. Análise de Dados.....	12
3. Resultados.....	14
3.1. Acurácia e Precisão do Sonicador.....	14
3.2. Comparação Entre Métodos de Gravação de Vibração.....	14
4. Discussão.....	16
4.1. Acurácia e Precisão do Sonicador.....	16
4.2. Comparação Entre Métodos de Gravação de Vibração.....	17
5. Conclusão.....	19
6. Material suplementar 1.....	20
7. Ilustrações.....	21
8. Referências.....	27

1. Introdução

Entre os polinizadores, as abelhas são reconhecidas como as mais importantes por dependerem completamente de recursos florais durante a fase larval e a fase adulta (Ollerton, 2017). O pólen, na maioria das vezes encontrado nas anteras, é um componente crítico da dieta das larvas das abelhas, uma vez que é a fonte primária de proteínas e aminoácidos (Kevan & Baker, 1983). Durante as visitas florais, indivíduos de 74% dos 508 gêneros de abelhas, equivalente a 58% de todas as espécies, realizam um comportamento de vibração específico para extrair o pólen das flores (Cardinal et al., 2018). Esse comportamento é necessário pois na maioria das flores que apresentam apenas o pólen como recurso aos polinizadores, as chamadas flores de pólen, este se encontra confinado em anteras poricidas que garantem acesso restrito aos grupos de abelhas capazes de realizar o comportamento de vibração (Vallejo-Marín et al., 2010). De fato, o pólen de plantas com anteras poricidas geralmente domina a dieta das abelhas capazes de realizar a vibração, muitas vezes constituindo mais de três quartos do total de sua dieta polínica (e.g., Camillo & Garofalo, 1989; Serra et al., 2012; Hilgert-Moreira et al., 2014).

Aproximadamente 6% das angiospermas de todo o mundo produzem grãos de pólen em anteras com esse tipo especial de deiscência, chamado poricida, e dependem primariamente de abelhas capazes de realizar vibração para sua reprodução (Buchmann, 1983; De Luca & Vallejo-Marín, 2013). Essas plantas (cerca de 22.000 espécies) estão distribuídas por todo o globo em 27 ordens, 72 famílias e 544 gêneros (Buchmann, 1983). Atualmente, existe uma quantidade suficiente de evidências para se acreditar que a evolução e a diversificação das angiospermas com anteras poricidas refletem a pressão de seleção exercida pelas abelhas vibradoras (De Luca & Vallejo-Marín, 2013; Russell et al., 2017). Entre as plantas com anteras poricidas estão cultivares agrícolas comuns como o tomate, a berinjela, alguns tipos de pimenta, mirtilos, “cranberries” e “kiwis”. Tomando o tomate como exemplo no Brasil, sua produção depende parcialmente do serviço de polinização de cerca de 30 espécies de abelhas vibradoras e, na ausência delas, a produção e a qualidade dos frutos é menor (Del Sarto et al., 2005; Silva-Neto et al., 2017).

O comportamento estereotipado de vibração floral, também conhecido como “buzz”, é executado somente por fêmeas, de diversos tamanhos, que tipicamente pousam na flor e curvam o ventre em torno das anteras, enquanto que, com suas mandíbulas, agarram a base dos estames (Buchmann, 1983). Em seguida, com as asas mantidas fechadas sobre a região dorsal do tórax e do abdômen, geram vibrações com os músculos indiretos de voo. Essas vibrações passam para a antera, sacudindo os grãos de pólen e fazendo com que saiam pelo poro apical (Buchmann &

Hurley, 1978; Buchmann, 1983; King & Buchmann, 2003). Durante esse comportamento, acredita-se que existam três propriedades fundamentais da vibração que interferem na liberação dos grãos de pólen: a duração, a frequência e a amplitude (De Luca & Vallejo-Marín, 2013).

A duração da vibração exercida pelas abelhas durante a visita floral é extremamente flexível, podendo variar de 0,1 até alguns segundos e o número de pulsos durante uma visita é igualmente inconstante (Vallejo-Marín, 2019). Por exemplo, abelhas do gênero *Bombus* sp. podem emitir de 1 a 17 pulsos de sonicação durante uma única visita (Buchmann & Hurley, 1978; De Luca & Vallejo-Marín, 2013). Ao contrário da duração, a frequência tende a apresentar uma maior constância durante as visitas. Porém, entre as diferentes espécies de abelhas cujo comportamento de vibração é conhecido, o pico fundamental da frequência de sonicação pode variar de 100 a 400 Hz (De Luca & Vallejo-Marín, 2013). Por fim, a amplitude se refere à quantidade de energia da vibração, a qual as abelhas possivelmente podem regular durante a visita em função da disponibilidade de pólen, do ajuste mecânico e a idade da flor (De Luca & Vallejo-Marín, 2013). A vibração das abelhas também pode variar de acordo com a morfologia da flor e com a umidade relativa do ar, e a vibração de forrageio e de defesa são significativamente diferentes (Switzer & Combes, 2017; Pritchard & Vallejo-Marín, 2020). Dessa forma, é de extrema importância que possamos estudar tais vibrações completamente, com suas variações de amplitude, frequência e duração e principalmente conseguir gravá-las e reproduzi-las para estudos posteriores.

Já existem trabalhos na literatura que descrevem métodos artificiais de vibração e polinização, dentre eles estão o uso do diapasão e mesa vibratória (King & Buchmann, 1996). Estudos mais recentes também demonstraram que o uso de equipamentos como uma escova de dentes elétrica também tem eficácia para estudos de vibração (Tayal et al., 2020). Reprodutores de som por vibração também já foram utilizados em trabalhos de polinização (Rodrigues et al., 2018; Brito et al., 2020; Rosi-Denadai et al., 2020), porém tais métodos não descrevem sua acurácia e precisão. A acurácia de um equipamento demonstra o quão próximo os valores reproduzidos estão dos valores esperados, e a precisão está relacionada a variação desses valores nas repetições de seu uso. Em espécies cultivadas, como *Solanum lycopersicum* e *Solanum melongena*, estudos de manipulação e programas de melhoramento necessitam da extração do pólen de acordo com a necessidade do pesquisador (Pessarakli & Dris, 2004). Dessa forma, um equipamento capaz de gerar vibrações com frequência, amplitude e duração precisas é de extrema importância para estudos de polinização por vibração.

O principal objetivo deste trabalho é desenvolver um sistema artificial de vibração caseiro e barato baseado em um alto-falante vibratório com placa de metal que permita simular o comportamento de sonicação de abelhas de diferentes tamanhos e com diferentes propriedades de vibração. Esse equipamento poderá ser utilizado tanto em laboratório quanto em campo. Pretendemos descrever a acurácia e a precisão desse equipamento - daqui para frente chamado de sonificador - em reproduzir as vibrações usando vibrometria óptica. Também vamos comparar os valores de frequência dominante e amplitude de vibração gravados com o vibrômetro laser com os valores obtidos através da análise de imagens de alta velocidade e os valores gerados a partir de um microfone direcional. Assim, tais dados também nos permitirão comparar esses três métodos para medir a vibração das abelhas em campo, um desafio ainda não superado nesse campo de pesquisa.

2. Material e Métodos

2.1. Desenvolvimento do sonificador

O sonificador foi construído a partir de um dispositivo de som por vibração (Youts Globe Super Speaker) que funciona através de uma placa de vibração metálica. Esse dispositivo opera através de uma fonte com entrada de 100~240V, 50/60Hz e 0,5A e saída de 12V, 1500mA e 18W. A frequência de resposta está entre 120Hz e 18KHz, ou seja, abrange a maior parte das sonicações que são produzidas por abelhas na natureza (De Luca & Vallejo-Marín, 2013). Na placa de metal foi fixado um conector metálico com etil-cianoacrilato (Super Bonder, Loctite), onde foi ligada uma haste de metal de 7,5 cm ao conector com auxílio de parafusos do próprio conector. Para seu funcionamento, o sonificador foi então acoplado em um computador (“computador A”; Dell I14-2640) em que os parâmetros da vibração (duração, frequência e amplitude) foram ajustados utilizando o software Audacity (disponível em: <https://www.audacityteam.org/>).

2.2. Montagem do sistema

O sonificador foi fixado a uma superfície imóvel, com o auxílio de grampos (Worker nylon tipo sargento), posicionado horizontalmente a uma altura de 15 centímetros e conectado com um cabo de audio p2 ao computador A. As ondas produzidas pelo sonificador foram gravadas pelos seguintes equipamentos: um vibrômetro laser doppler (Polytec PDV100) sobre um tripé, um gravador de voz simples (Sony ICD-PX240 – Mono) acoplado a um microfone direcional (Shotgun Yoga Ht 81) e uma câmera de alta velocidade (Câmera Digital Sony Cyber-shot DSC-RX100 V) (Fig 1 e 2). O laser do vibrômetro foi apontado diretamente para a ponta da haste de metal em um ângulo de 90°, a 30 centímetros da ponta da haste. O microfone direcional foi posicionado a 3 centímetros da haste a uma angulação de 45° e a câmera fotográfica foi posicionada lateralmente a haste a uma distância de 4 centímetros (Fig 1 e 2).

2.3 Vibrômetro

O vibrômetro permite estimar a velocidade de deslocamento da haste de metal em relação ao tempo. As configurações do vibrômetro foram filtro low pass 5Hz, nenhum filtro high pass e velocidade do laser de “500 mm/s”. Para coletar as vibrações medidas pelo vibrômetro,

operamos o software VibSoft-20 (Polytec, Waldbronn, Germany) em um segundo computador (“computador B”; Dell I14-2640) ao qual o vibrômetro foi conectado. As especificações do software foram frequência de amostragem de 12kHz, resolução de 781.25mHz, largura de banda de 5kHz e duração da amostragem de 1.28s.

2.4. Câmera de alta velocidade

Atrás da haste do sonicador foi posicionado um tripé acoplado a um papel milimetrado, com uma marcação fixa para a futura análise de deslocamento. Todas as gravações foram feitas no modo “high frame rate”, a 960 fps em qualidade máxima. As gravações foram feitas seguindo horários restritos do dia levando em consideração a ocorrência de luz solar, devido a impossibilidade de coleta utilizando iluminação artificial, pois a frequência de cintilação luminosa das lâmpadas é pequena em relação a frequência de gravação da câmera, resultando em vídeos com oscilação de iluminação. A câmera fotográfica nos permite estimar os parâmetros da vibração a partir da análise das imagens capturadas (Timerman & Barrett 2019). Para análise dos vídeos foi utilizado o software DLTdv8 digitizing tool (Software por MATLAB, <https://biomech.web.unc.edu/dltdv/>), onde foi feita a medição do deslocamento da haste fixada no conector metálico do sonicador. A medição ocorre com o estabelecimento de um pixel do vídeo e com a variação do deslocamento deste mesmo pixel em relação a um referencial fixo ao longo de cada frame. As mudanças de posição do pixel geram valores que constituem a onda de vibração.

2.5. Microfone e gravador

As gravações acústicas feitas pelo microfone direcional seguiram a configuração padrão do equipamento no modo “Tele”. O mesmo foi conectado ao gravador, que também seguiu o parâmetro padrão de configuração, utilizando somente o modo de redução de ruídos do próprio equipamento e uma taxa de amostragem de 44,1 kHz.

2.6. Geração e gravação das vibrações

As vibrações a serem reproduzidas no sonicador foram geradas no software Audacity. Uma vez que em condições naturais as abelhas vibram na faixa de 100Hz a 400Hz (De Luca &

Vallejo-Marín, 2013), nós ajustamos as frequências de entrada no sonicador de 100Hz a 500Hz em intervalos de 50Hz. Por outro lado, a amplitude de entrada variou de 100 a 20 unidades de volume do software Windows em intervalos de 20 unidades, mantendo sempre o ajuste de volume do próprio sonicador e do programa Audacity fixos em seus máximos. A forma das ondas geradas foi a seno com duração de 20 segundos, para possibilitar a gravação em todos os equipamentos de forma simultânea. Foram feitas três séries por sonicador e foram utilizados dois sonicadores, totalizando seis séries. Cada série conteve 45 arquivos com combinações de frequência e amplitude conforme descrito acima para cada um dos equipamentos. O número de dados por equipamento foi de 270, totalizando 810 com os três equipamentos (vibrômetro laser, câmera e microfone). Os arquivos finais foram gerados nos formatos .csv, .txt, .mp3 para a câmera, vibrômetro e microfone, respectivamente.

2.7. *Análise dos dados*

A partir das vibrações gravadas com o vibrômetro, a câmera de alta velocidade e o microfone, construímos oscilogramas para analisar visualmente os aspectos gerais de todas as ondas (Material Suplementar 1). Dado a alta variação das ondas no início das gravações em todos os equipamentos, selecionamos apenas uma janela de 0,6s de cada onda para estimar as frequências dominantes e amplitudes. Essa janela foi posicionada no final das ondas gravadas pelo vibrômetro e pela câmera de alta velocidade e no final dos primeiros 10s gravados pelo microfone (Material Suplementar 1).

As frequências dominantes das ondas obtidas pelo vibrômetro e pelo microfone foram estimadas a partir da função *dfreq* do pacote *seewave* do software R (disponível em <https://www.rstudio.com/>) (Sueur et al. 2008). Nesse caso, utilizamos uma janela do tipo “hanning” de comprimento 512 amostras e uma sobreposição de 70%. A função *dfreq* estima os valores de frequência dominante para cada unidade de tempo a partir do valor de energia máxima do espectro obtido em uma transformação de Fourier de tempo curto (Sueur 2018). Dessa forma, nós definimos a frequência dominante de toda a onda analisada como a moda das frequências dominantes obtidas a partir dessa função. Por outro lado, uma vez que a taxa de amostragem dos vídeos obtidos com a câmera de alta velocidade é muito baixa (i.e. 960 fps), a frequência dominante a partir desse dispositivo foi obtida de maneira diferente. Nesse caso, nós estimamos primeiramente o período da frequência dominante usando a função *findfrequency* do pacote *forecast* do software R (disponível em <https://www.rstudio.com/>) (Hyndman et al.

2021; Hyndman & Khandakar 2008). Essa função estima a função de densidade espectral a partir do melhor modelo auto regressivo baseado no Critério de Informação de Akaike. A partir disso, a função retorna o período da onda quando existe um valor alto de máxima densidade espectral na frequência dominante. Quando não é possível detectar um alto valor de densidade, a função retorna o valor 1. A partir do período T da onda estimado, é possível calcular a frequência dominante como $1/T$. Os 33 casos em que essa função não conseguiu estimar valores de frequência dominante foram desconsiderados nas análises.

A amplitude das ondas obtidas através de cada equipamento foi calculada como a raiz dos valores quadráticos médios, também chamada de RMS (do inglês *root mean square*). Vale a pena lembrar que os equipamentos medem as amplitudes de vibração a partir de diferentes fenômenos. O vibrômetro retorna a amplitude da velocidade de deslocamento da haste de metal em mm/s. Com os vídeos produzidos a partir da câmera de alta velocidade e o software DLTdv8 digitizing tool é possível medir a amplitude de deslocamento no eixo horizontal em pixels. E, por fim, a partir dos sons coletados com o microfone, é possível medir a amplitude de deslocamento do ar em decibéis (dB).

Nós ajustamos modelos lineares mistos para entender a influência da frequência e da amplitude de entrada na frequência dominante e amplitude de velocidade gravadas pelo vibrômetro laser. Nesse caso, a frequência de entrada e o volume do computador foram considerados fatores fixos e o sonificador (A ou B) foi considerado um fator aleatório. As variáveis respostas foram a frequência dominante e o valor RMS da amplitude de velocidade. A partir do resultado dessas análises podemos entender a acurácia e a precisão do sonificador em simular vibrações de abelhas com diferentes valores de frequência e amplitude. Por fim, para comparar a frequência dominante e a amplitude do sonificador medidas a partir do vibrômetro laser e, respectivamente, da câmera de alta velocidade e do microfone direcional, nós realizamos testes de correlação de Pearson.

3. Resultados

3.1. Acurácia e precisão do sonicador

O sonicador tem alta precisão e acurácia na reprodução de frequências de vibração, mas na reprodução de amplitude de velocidade, apesar de existir uma relação entre os valores de entrada e os de reprodução, não há essa mesma tendência. Entre os valores de frequência dominante medidos a partir do vibrômetro laser, apenas 11% ficaram fora do espectro de frequência de entrada. A frequência dominante produzida pelo sonicador depende tanto da frequência de entrada quanto do volume configurados no computador (Fig. 3A; $F_{\text{interação}} = 12,10$; $\text{DenDf} = 265$; $p < 0,01$). O sonicador reproduz com alta precisão e acurácia valores de frequência entre 100 e 400 Hz combinados com volumes entre 20 e 60%. Por outro lado, quando os valores de frequência e volume de entrada foram acima de 400 Hz e os valores de volume foram acima de 80%, o sonicador produziu frequências dominantes fora do espectro esperado, chegando a valores acima de 4000 Hz.

Existe uma relação positiva entre a amplitude de velocidade produzida pelo sonicador e ambos a frequência de entrada e o volume ajustados no computador (Fig. 3B; $F_{\text{interação}} = 24,28$; $\text{DenDf} = 261,22$; $p < 0,01$). Porém, medidas repetidas com os mesmos valores de frequência de entrada e volume nem sempre produzem exatamente os mesmos valores de amplitude de velocidade no sonicador. Apesar do sonicador reproduzir valores semelhantes de amplitude de velocidade nas frequências de entrada entre 100 a 200 Hz e volume de 20 e 40%, a precisão e a acurácia da amplitude de vibração reproduzidas diminuem em valores de entrada mais altos.

3.2. Comparação entre métodos de gravação de vibração

As gravações feitas tanto pela câmera de alta velocidade quanto pelo microfone permitiram boas estimativas dos valores de frequência dominante produzidos pelo sonicador (Fig 4). Apesar dos valores de frequência dominante estimados a partir das ondas gravadas pelo vibrômetro e os outros dois gravadores estarem correlacionados ($\text{cor}_{\text{vibrometro-câmera}} = 0,40$; $\text{df} = 235$; $p < 0,01$; $\text{cor}_{\text{vibrometro-microfone}} = 0,13$; $\text{df} = 268$; $p < 0,05$), é possível observar que os altos valores de frequência dominante não foram igualmente estimados pelos outros dois gravadores. Nesses casos, valores de frequência dominante gravados a partir do vibrômetro acima de 1000Hz foram estimados como ondas com frequência dominante de aproximadamente 500Hz tanto pela câmera quanto pelo microfone. Por outro lado, algumas frequências dominantes de

100 e 250Hz gravadas pelo vibrômetro foram superestimadas pelas gravações a partir do microfone em 500 e 750Hz respectivamente.

Tanto a câmera quanto o microfone também reproduzem a amplitude das vibrações produzidas pelo sonicador. Apesar desses equipamentos medirem as amplitudes de vibração de fenômenos diferentes, os valores de amplitude das ondas gravadas pela câmera e pelo microfone foram correlacionados aos valores de amplitude gravados pelo vibrômetro (Fig 5; $cor_{\text{vibrometro-microfone}} = 0.85$; $df = 268$; $p < 0.01$ e $cor_{\text{vibrometro-câmera}} = 0.67$; $df = 268$; $p < 0.01$).

4. Discussão

Estudos sobre polinização por vibração têm aumentado nos últimos 10 anos (De Luca & Vallejo-Marín, 2013; Russell et al., 2017; Dellinger et al., 2019; Brito et al., 2020). Assim, equipamentos que permitam uma boa reprodução e gravação das vibrações produzidas pelas abelhas são extremamente necessários. Porém, esses equipamentos são muito caros e difíceis de serem utilizados em campo. Equipamentos mais utilizados, como o osciloscópio e a mesa de vibração, custam em torno de R\$5.559,00 e R\$1.700,00 respectivamente. Além disso, dado o tamanho e a sensibilidade desses equipamentos, sua utilização em campo é delicada.

O sonicador aqui estudado tem alta precisão e acurácia na reprodução de frequências de vibração. Porém para reprodução de amplitudes é necessário prévia calibração, já que, apesar de existir uma relação positiva entre a amplitude e os valores de frequência de entrada e o volume ajustados no computador, os valores de amplitude produzidos não seguem um padrão previsível. As gravações feitas tanto pela câmera de alta velocidade quanto pelo microfone também permitiram boas estimativas dos valores de frequência dominante e amplitudes produzidos pelo sonicador, indicando que os vídeos de alta velocidade também podem ser uma boa alternativa para o campo.

4.1. Acurácia e precisão do sonicador

Nossos resultados indicam que uma simples caixa de som por vibração pode ser usada para produzir vibrações na mesma faixa de frequência e amplitude que as abelhas produzem na natureza com certa acurácia e precisão. Entretanto, em alguns poucos casos, foram reproduzidas frequências muito acima do esperado. As caixas de som por vibração são projetadas para serem utilizadas em contato direto com superfícies e esse contato pode alterar as vibrações finais que são produzidas pelo sistema caixa-superfície produzindo as vibrações desejadas. Por outro lado, em nossos experimentos, a placa de vibração não estava em contato direto com uma superfície e vibrou livremente. Assim, é possível que as altas frequências produzidas pelo sonicador quando as frequências e o volume de entrada foram altos sejam apenas uma consequência do uso diferente daquele para o qual o equipamento foi originalmente projetado. É interessante notar também que, as frequências acima de 1000Hz medidas pelo vibrômetro foram estimadas na faixa esperada tanto pela câmera quanto pelo microfone. Isso pode ter acontecido porque o vibrômetro laser é um método mais sensível a vibrações de alta frequência que a câmera e o

microfone. O vibrômetro opera com a tecnologia DSP (do inglês, *digital signal processing*) tornando possível realizar excelentes medições, uma vez que o sinal gravado pode ser transportado diretamente para o computador por um cabo digital sem qualquer perda de precisão (Polytec, 2009). Assim, vibrações em frequências muito altas, como aquelas produzidas por ressonância da haste de metal utilizadas nesse estudo, possivelmente também foram captadas pelo vibrômetro.

A amplitude de vibração é um dos principais parâmetros que interferem na coleta de pólen por abelhas vibradoras, juntamente com a duração e a frequência (De Luca & Vallejo-Marín, 2013). Em nosso equipamento, apesar de existir uma relação positiva entre as amplitudes de entrada e saída, a amplitude nem sempre é reproduzida com precisão e acurácia, o que indica que não há como prever diretamente a amplitude de saída a partir da amplitude de entrada. Desta forma, o sonicador precisa ser calibrado antes de ser usado quando for necessário reproduzir amplitudes de vibrações específicas. Ainda assim, o sonicador se sobressai em relação aos demais métodos utilizados para a produção de vibrações, como o diapasão (King & Buchmann, 1996) e a escova de dentes elétrica (Tayal et al., 2020), pois estes métodos não permitem a reprodução de amplitudes específicas. Além disso, quando aplicada, a amplitude pode variar com certa imprevisibilidade de acordo com a energia obtida pelo choque físico do diapasão e com o status da bateria da escova. Como o sonicador opera diretamente ligado a um cabo de energia, não há alterações consideráveis nas amplitudes ao longo de sua reprodução. Logo, dentre as atuais alternativas, mesmo com necessidade de calibração nas amplitudes reproduzidas, o sonicador permite um espectro de combinações de frequências e amplitudes muito maior e dentro da faixa que as abelhas vibradoras produzem.

4.2. Comparação entre métodos de gravação de vibração

De maneira geral, todos os métodos de gravação utilizados neste estudo apresentaram viabilidade na mensuração das vibrações produzidas pelo sonicador. Apesar dos valores de correlação entre as frequências dominantes gravadas pelo vibrômetro e as gravadas pelo microfone e pela câmera serem baixos, as gravações de frequência dominante feitas por esses dois últimos equipamentos podem ser boas alternativas para o campo. Como vimos, a alta sensibilidade do vibrômetro pode ter superestimado as vibrações medidas no topo da haste de metal. Por outro lado, as gravações acústicas realizadas pelo microfone bem como as estimadas através dos vídeos de alta velocidade raramente ultrapassam os valores de 500 Hz. Porém, uma

vez que os vídeos em alta velocidade são gravados a uma taxa de 960 fps, esse método fica inviável para frequências entre 450 e 500 Hz. De fato, 12% de todas as vibrações, especificamente aquelas entre 450 e 500 Hz, não puderam ser estimadas pela câmera utilizada neste estudo. Isso possivelmente ocorreu pois, para uma boa representação de onda, são necessárias pelo menos duas amostras por ciclo, fenômeno denominado de *aliasing*. Assim, a frequência de amostragem deve ser pelo menos duas vezes mais alta que a frequência dominante da onda (Sueur 2018). Esse mesmo efeito não ocorre com o microfone, uma vez que sua taxa de amostragem é de 44,1 kHz, ou seja, muito maior que a frequência das vibrações produzidas.

A câmera e o microfone também conseguiram reproduzir a amplitude das vibrações do sonificador com certa precisão. Mesmo utilizando medidas diferentes, como decibéis para o microfone e deslocamento em pixels para a câmera, a correlação para tais métodos de gravação foi de 88% e 67% respectivamente. Embora a vibração mecânica e o som sejam produzidos quase que simultaneamente, as propriedades de transmissão do ar são diferentes das dos sólidos e alguns fatores externos como vento, a densidade do ar e a distância do microfone para a fonte de vibração podem ter influência nas propriedades de sua transmissão, principalmente na amplitude (Cocroft & De Luca, 2006). Por outro lado, as amplitudes gravadas pela câmera possuem maior fidelidade uma vez que permitem o estabelecimento de um referencial único fixo para o cálculo da vibração em cada *frame*.

Tanto a câmera quanto o microfone são viáveis para gravação de vibrações, principalmente para frequências. Apesar dos valores de frequência e amplitude gerados pela câmera terem menor correlação com os mesmos valores gerados pelo vibrômetro, ela ainda assim é viável devido a sua facilidade de uso em campo. Com a câmera, podemos gravar visitas de abelhas vibratórias diretamente na flor, possibilidade que o vibrômetro laser, apesar da sua alta precisão, não permite. Embora o microfone seja portátil e de fácil manuseio, as gravações acústicas geradas por ele tem uma relação variável entre o referencial e a distância do gravador, podendo gerar alterações indesejadas. Portanto pode ser difícil inferir a verdadeira amplitude de uma vibração de sonicação a partir de uma gravação feita pelo microfone. Sendo assim, durante uma visita de uma abelha a uma flor em campo, a amplitude relativa das vibrações transmitidas pelo substrato podem não coincidir com a amplitude do som correspondente que a gravação acústica captada pelo ar (De Luca, 2018.)

5. Conclusão

Com esses dados podemos concluir que o sonicador pode ser uma boa alternativa para reproduzir as vibrações das abelhas em campo e em laboratório. Sendo um equipamento de baixo custo, fácil manuseio e com precisão e acurácia descritas, sua utilização para estudos é considerável, principalmente quando necessária a utilização de frequências e amplitudes específicas, desde que calibrado previamente. Vimos também que a câmera de alta velocidade e o microfone são métodos que podem ser implementados em campo, devido a sua praticidade e por apresentarem bons resultados nas gravações de frequência dominante. Ademais, as amplitudes de vibração são melhor estimadas pela câmera, pois essa permite um referencial fixo em cada *frame*. Esperamos que os dados aqui levantados e analisados possam contribuir em futuros estudos envolvendo polinização por vibração em campo e em laboratório.

6. Material suplementar 1

Oscilogramas produzidos a partir das vibrações gravadas com o vibrômetro laser (plots da coluna esquerda), gravadas com a câmera de alta velocidade (plots da coluna central) e gravadas com o microfone acoplado ao gravador (plots da coluna direita). A faixa colorida em todos os plots se referem ao segmento da onda utilizada nas análises.

7. Ilustrações

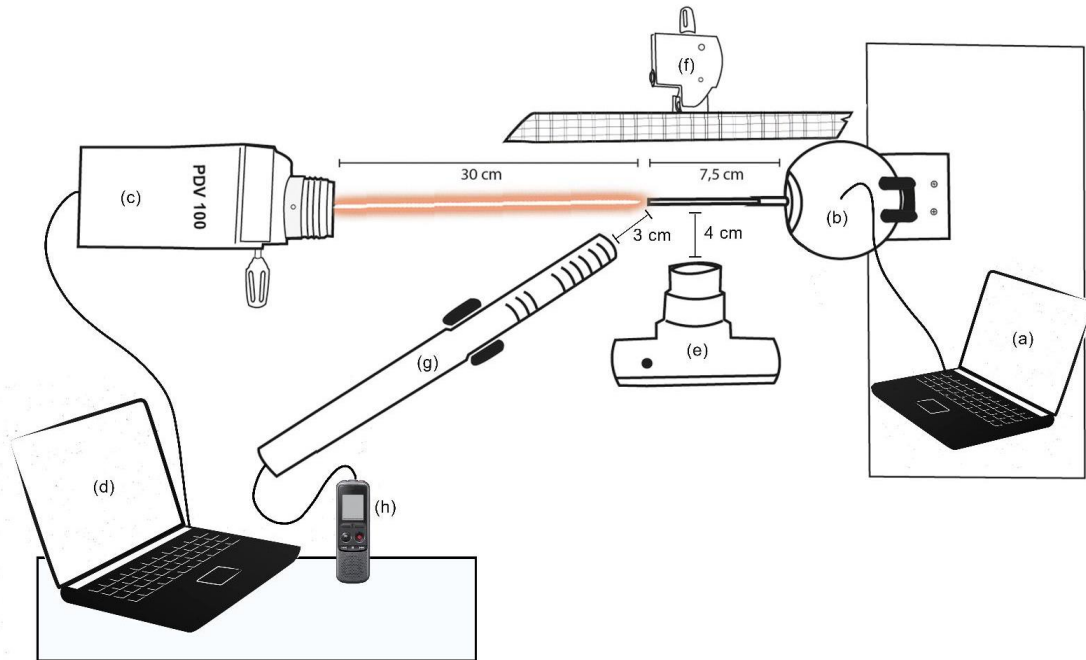


Figura 1: Esquema da montagem do sistema utilizado para a coleta dos dados. A mesma configuração se manteve durante toda a coleta. (a) computador A, utilizado para gerar as ondas com o software Audacity, (b) sonificador, (c) vibrômetro laser, (d) computador B, conectado ao software Vibsoft 20 para as gravações com o vibrômetro laser (e) câmera, (f) tripé com papel milimetrado, com referencial fixo (g) microfone, (h) gravador.

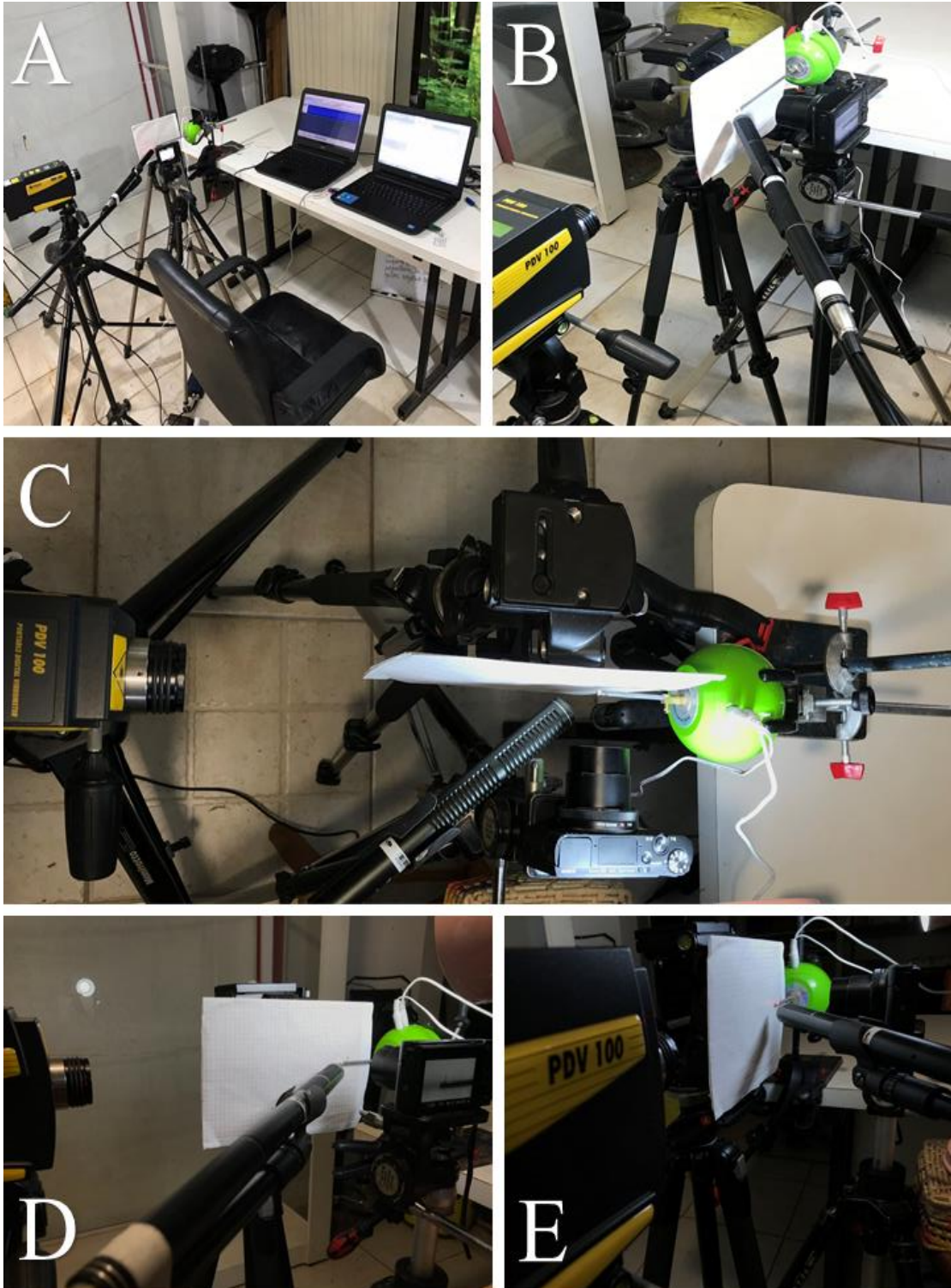


Figura 2: (A) Visão geral do sistema de coleta, com todos os equipamentos em suas posições fixas (Computador A, computador B, câmera, vibrômetro, microfone, gravador e papel milimetrado), (B) visão lateral do sistema, (C) visão superior com enfoque nas angulações, sendo elas de 90° entre vibrômetro e haste e de 45° entre microfone e haste, (D) perspectiva do microfone em relação a haste, (E) perspectiva do vibrômetro em relação a haste, evidenciando o laser na extremidade da mesma.

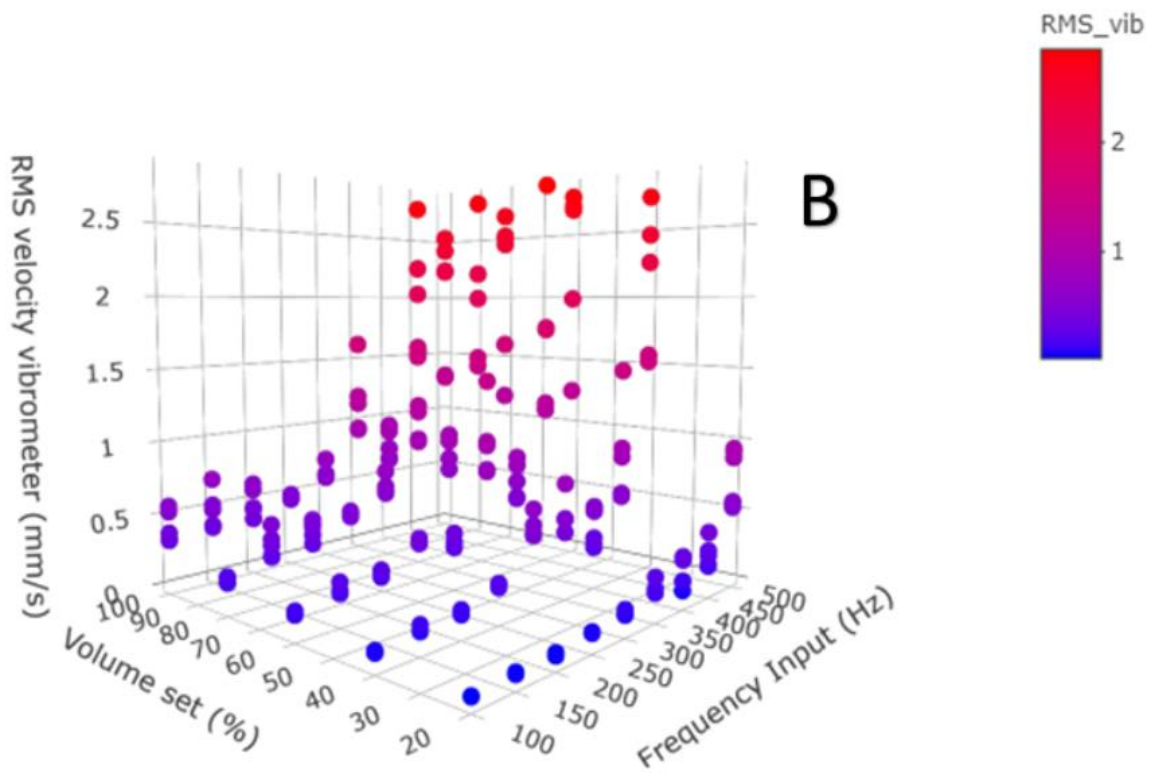
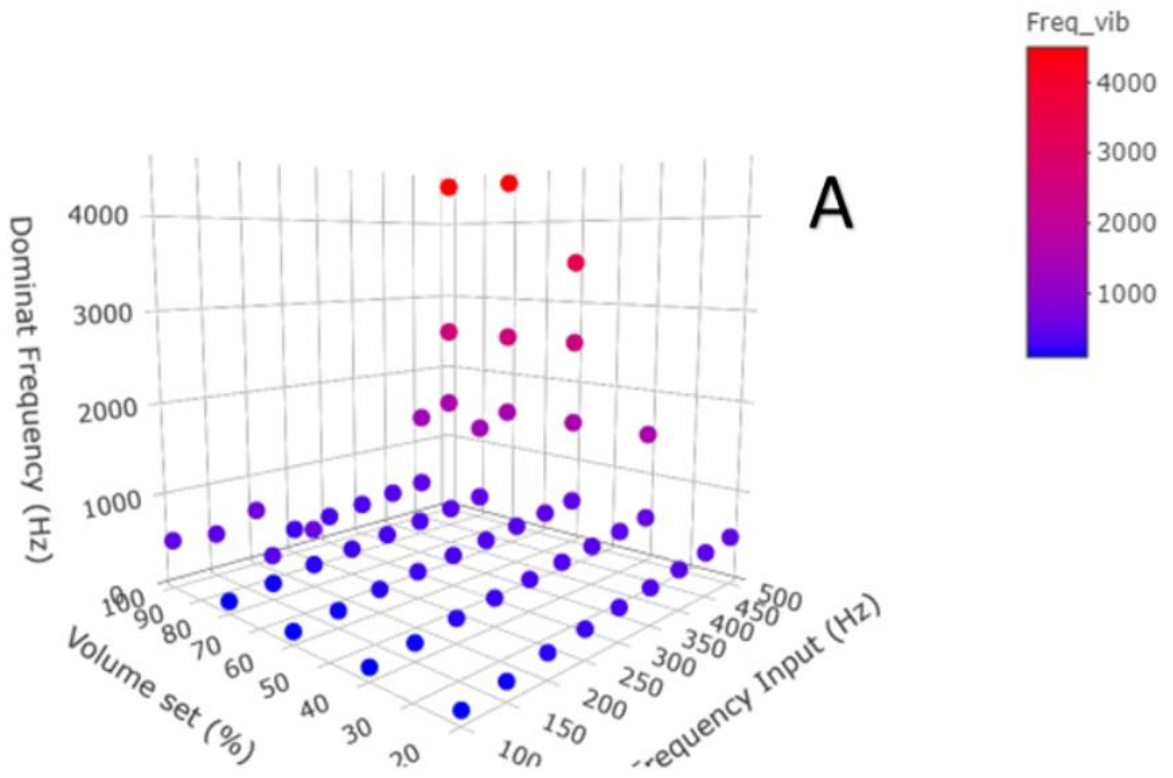


Figura 3: (A) Frequências dominantes reproduzidas pelo sonicador variando em função da frequência de entrada gerada no software Audacity e do volume configurado no computador. (B) Amplitudes reproduzidas pelo sonicador variando em função da frequência de entrada gerada no software Audacity e do volume configurado no computador. Os valores cujos pontos se destoam no gráfico indicam que houve diferença na reprodução entre os dois sonicadores e os valores gerados pelo Audacity. Já os pontos que se sobrepõem demonstram precisão e acurácia na reprodução. Em ambos os gráficos, frequências de entrada altas (frequency input), combinados com volumes de entrada altos (volume set %), resultaram em valores fora do esperado, mostrando assim que as reproduções do sonicador são mais precisas e acuradas em valores de entrada mais baixos.

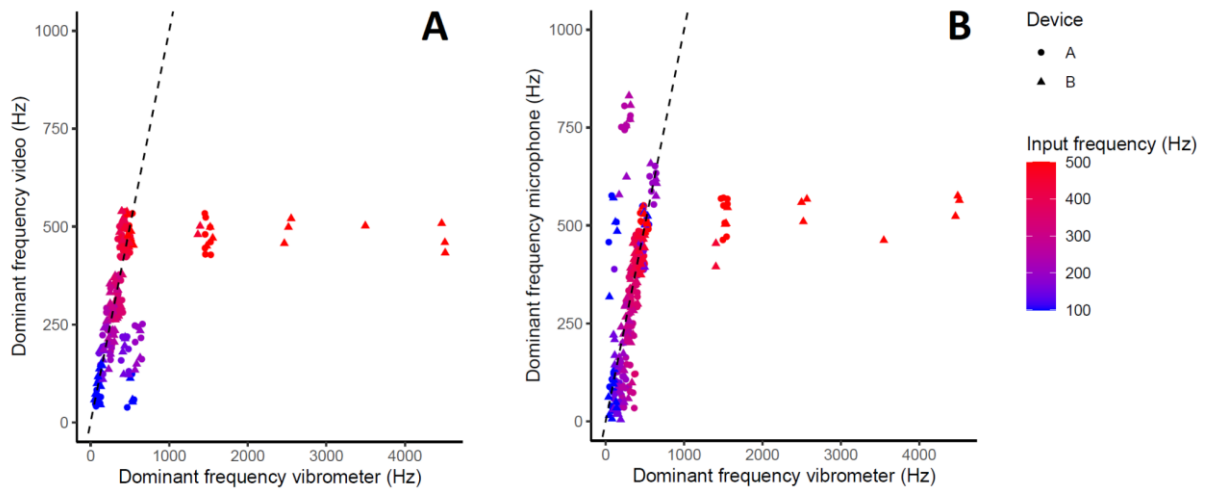


Figura 4: (A) Comparação entre as gravações de frequência dominante realizadas entre o vibrômetro laser (eixo x) e as gravações de frequência dominante realizadas pela câmera de alta velocidade (eixo y). (B) Comparação entre as gravações de frequência dominante realizadas entre o vibrômetro laser (eixo x) e as gravações de frequência dominante realizadas pelo microfone (eixo y). A linha tracejada indica quando as frequências gravadas por ambos os equipamentos foram iguais. Pontos à direita da linha são valores que foram superestimados pelo vibrômetro. Pontos à esquerda da linha são valores que foram superestimados pela câmera ou pelo microfone. As frequências de entrada utilizadas foram de 100 a 500 Hz em intervalos de 50 Hz. Os símbolos \blacktriangle \bullet representam os dois sonicadores (A e B) utilizados. jitter horizontal = 0,7.

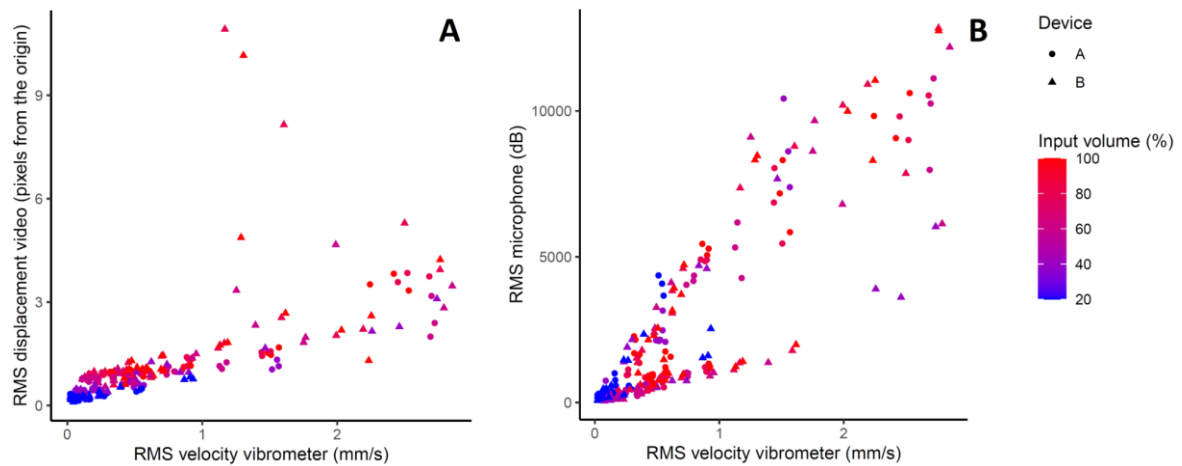


Figura 5: (A) Relação entre as amplitudes gravadas com o vibrômetro laser medidas em mm/s (eixo x), com as amplitudes estimadas com os vídeos de alta velocidade medidas em deslocamento de pixels (eixo y). (B) Relação entre as amplitudes gravadas com o vibrômetro laser medidas em mm/s (eixo x) com as amplitudes gravadas pelo microfone medidas em decibéis (eixo y). O volume de entrada do computador variou de 20 a 100% em intervalos de 20. Os símbolos \blacktriangle \bullet representam os dois sonificadores (A e B) utilizados.

8. Referências

- BRITO, V. L. G., NUNES, C. E. P., RESENDE, C. R., MONTEALEGRE-ZAPATA, F., & VALLEJO-MARÍN, M. Biomechanical properties of a buzz-pollinated flower. **Royal Society Open Science**, v. 7, n. 9, 201010, 2020.
- BUCHMANN, S. L.; HURLEY, J. P. A biophysical model for buzz pollination in angiosperms. **Journal of Theoretical Biology**, v. 72, n. 4, p. 639-657, 1978.
- BUCHMANN, S. L. Buzz pollination in angiosperms. In: Jones CE, Little RJ. (eds.) **Handbook of Experimental Pollination Biology**. New York, Van Nostrand Reinhold. p. 73-113, 1983.
- CAMILLO, E.; GAROFALO, C. A. Analysis of the niche of two sympatric species of *Bombus* (Hymenoptera, Apidae) in southeastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 5, n. 1, p. 81-92, 1989.
- CARDINAL, S.; BUCHMANN, S. L.; RUSSELL, A. L. The evolution of floral sonication, a pollen foraging behavior used by bees (*Anthophila*). **Evolution**, v. 72, n. 3, p. 590-600, 2018.
- COCROFT, R. B.; DE LUCA, P. Size-frequency relationships in insect vibratory signals. **Insect sounds and communication: Physiology, behavior, ecology and evolution**. CRC, New York, v. 99, p. 110, 2006.
- DE LUCA, P. A.; VALLEJO-MARÍN, M. What's the 'buzz'about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. **Current opinion in plant biology**, v. 16, n. 4, p. 429-435, 2013.
- DE LUCA, P. A.; GIEBINK, N.; MASON, A. C.; PAPA, D. BUCHMANN, S. L. How well do acoustic recordings characterize properties of bee (*Anthophila*) floral sonication vibrations?, **Bioacoustics**, v. 29, n. 1, p. 1-14, 2018.
- DEL SARTO, M. C. L.; PERUQUETTI, R. C.; CAMPOS, L. A. O. Evaluation of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as pollinator of greenhouse tomatoes. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 2, p. 260-266, 2005.
- DELLINGER, A.S., CHARTIER, M., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, D., PENNEYS, D.S., ALVEAR, M., ALMEDA, F., MICHELANGELI, F.A., STAEDLER, Y., ARMBRUSTER, W.S, SCHÖNENBERGER, J. Beyond buzz-pollination – departures from an adaptive plateau lead to new pollination syndromes. **New Phytologist**, v. 221, n.2, p. 1136-1149, 2019.

HYNDMAN R. J, KHANAKAR Y . “Automatic time series forecasting: the forecast package for R.” **Journal of Statistical Software**, v. 26, n. 3, p. 1-22, <URL:<https://www.jstatsoft.org/article/view/v027i03>> 2008.

HYNDMAN R, ATHANASOPOULOS G, BERGMEIR C, CACERES G, CHHAY L, O'HARA-WILD M, PETROPOULOS F, RAZBASH S, WANG E, YASMEEN F. *forecast: Forecasting functions for time series and linear models*. R package version 8.14, <URL:<https://pkg.robjhyndman.com/forecast/>> 2021.

HILGERT-MOREIRA, S. B.; NASCHER, C. A.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; BLOCHTEIN, B. Pollen resources and trophic niche breadth of *Apis mellifera* and *Melipona obscurior* (Hymenoptera, Apidae) in a subtropical climate in the Atlantic rain forest of southern Brazil. **Apidologie**, v. 45, n. 1, p. 129-141, 2014.

KEVAN, P. G.; BAKER, H. G. Insects as flower visitors and pollinators. **Annual review of entomology**, v. 28, n. 1, p. 407-453, 1983.

KING, M. J.; BUCHMANN, S. L. Sonication dispensing of pollen from *Solanum laciniatum* flowers. **Functional Ecology**, p. 449-456, 1996.

KING, M. J.; BUCHMANN, S. L. Floral sonication by bees: mesosomal vibration by *Bombus* and *Xylocopa*, but not *Apis* (Hymenoptera: Apidae), ejects pollen from poricidal anthers. **Journal of the Kansas Entomological Society**, p. 295-305, 2003.

OLLERTON, J. Pollinator diversity: distribution, ecological function, and conservation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 48, p. 353-376, 2017.

PESSARAKLI, M. M., DRIS, R. Pollination and breeding of eggplants. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 2, p. 218-219, 2004.

POLYTEC PDV-100 USER MANUAL. p. 11, 2009. Acessado em 11/05/2021, disponível em <<https://www.manualslib.com/manual/1730093/Polytec-Pdv-100.html>>

PRITCHARD, D. J.; VALLEJO-MARÍN, M. Floral vibrations by buzz-pollinating bees achieve higher frequency, velocity and acceleration than flight and defence vibrations. **Journal of Experimental Biology**, v. 223, n. 11, 2020.

RODRIGUES, E. V., RIGUETTE, J. R., PEREIRA, H. R., TESCH, J. A., & SILVA, A. G. (2018). An affordable apparatus for fine-controlled emulation of buzzing frequencies of bees

- for the testing hypothesis in buzz interactions. **Ecology and evolution**, v. 8, n. 15, p. 7667-7672, 2018.
- ROSI-DENADAI, C. A., ARAÚJO, P. C. S., CAMPOS, L. A. D. O., COSME JR, L., & GUEDES, R. N. C. . Buzz-pollination in Neotropical bees: genus-dependent frequencies and lack of optimal frequency for pollen release. **Insect Science**, v. 27 n. 1, p. 133-142, 2020.
- RUSSELL, A. L.; BUCHMANN, S. L.; PAPA, D. R. How a generalist bee achieves high efficiency of pollen collection on diverse floral resources? **Behavioral Ecology**, v. 28, n. 4, p. 991-1003, 2017.
- SERRA, B. D.; LUZ, C. F.; CAMPOS, L. A. Vieira et al. The use of polliniferous resources by *Melipona capixaba*, an endangered stingless bee species. **Journal of insect science**, v. 12, n. 1, 2012.
- SILVA-NETO, C. M.; BERGAMINI, L. L.; ELIAS, M. A. S.; MOREIRA, G. L.; MORAIS, J. M.; BERGAMINI, B. A. R.; FRANCESCHINELLI, E. V. High species richness of native pollinators in Brazilian tomato crops. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 3, p. 506-513, 2017.
- SUEUER J, AUBIN T, SIMONIS C. Seewave: a free modular tool for sound analysis and synthesis. **Bioacoustics**, v. 18, n. 2, p. 213-226, 2008.
- SUEUER, J. Sound analysis and synthesis with R. Culemborg, the Netherlands: **Springer**. 2018
- SWITZER, C. M.; COMBES, S. A. Bumblebee sonication behavior changes with plant species and environmental conditions. **Apidologie**, v. 48, n. 2, p. 223-233, 2017.
- TAYAL, M; CHAVANA, J; KARIYAT, R. Efficiency of using electric toothbrush as an alternative to a tuning fork for artificial buzz pollination is independent of instrument buzzing frequency. **BMC ecology**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2020.
- TIMERMAN, D; BARRETT, S.C.H. Comparative analysis of pollen release biomechanics in *Thalictrum*: implications for evolutionary transitions between animal and wind pollination. **New Phytologist**. v. 224, n. 3, p. 1121–1132, 2020.
- VALLEJO-MARÍN, M. Buzz pollination: studying bee vibrations on flowers. **New Phytologist**, v. 224, n. 3, p. 1068-1074, 2019.

VALLEJO-MARÍN, M.; DA SILVA, E. M.; SARGENT, R. D.; BARRETT, S. C. Trait correlates and functional significance of heteranthery in flowering plants. **New Phytologist**, v. 188, n. 2, p. 418-425, 2010.