

MAYLA GAVA

**COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM *Plebeia lucii* MOURE, 2004
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

G279c
2016
Gava, Mayla, 1991-
Comportamento higiênico em *Plebeia lucii* Moure, 2004
(Hymenoptera: Apidae: Meliponini) / Mayla Gava. – Viçosa,
MG, 2016.
vii, 30f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.23-26.

1. Abelhas sem ferrão - Comportamento. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa
de Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 595.79

MAYLA GAVA

**COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM *Plebeia lucii* MOURE, 2004
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 12 de agosto de 2016.

Terezinha Maria Castro Della Lucia

Weyder Cristiano Santana

Lucio Antônio de Oliveira Campos
(Orientador)

Dedico este trabalho aos meus pais, exemplos de coragem, simplicidade e honestidade.

“Para tudo há uma ocasião, e um tempo para cada propósito debaixo do céu: tempo de nascer e tempo de morrer, tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou, tempo de matar e tempo de curar, tempo de derrubar e tempo de construir, tempo de chorar e tempo de rir, tempo de prantear e tempo de dançar, tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntá-las, tempo de abraçar e tempo de se conter, tempo de procurar e tempo de desistir, tempo de guardar e tempo de lançar fora, tempo de rasgar e tempo de costurar, tempo de calar e tempo de falar, tempo de amar e tempo de odiar, tempo de lutar e tempo de viver em paz”.

(Eclesiastes 3:1-8, NVI)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de estudo e aprendizado.

Ao programa de Pós-graduação em Entomologia, por ter possibilitado a realização da pesquisa.

À FAPEMIG, pela concessão de bolsa, à CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Lúcio Antônio de Oliveira Campos, pelo acolhimento, dedicação ao meu trabalho e ensinamentos sobre a vida e sobre as abelhas.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite e pelas preciosas sugestões acrescentadas a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Cosme Damião Cruz pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Dr. Riudo Paiva pela amizade, parceria e valiosos conhecimentos compartilhados durante toda a execução desse trabalho.

Ao Dr. Weyder Santana e aos técnicos, em especial a Iris Estanciola, pelo suporte no desenvolvimento das atividades.

Aos queridos “Abelhudos” e “agregados”, Crislayne, Geisyane, Ana Dária, Werneck, Lucas, Paula, Evelyn, Denise e Talitta, pela amizade e companheirismo, em especial, Priscila, Camila, Fernando e André pelos conhecimentos compartilhados que muito contribuíram para a realização deste trabalho. Vocês tornaram os meus dias mais leves e divertidos.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio e encorajamento. Vocês são os meus maiores exemplos de força e fé.

Ao meu sobrinho Davi, por trazer mais alegria aos meus dias.

Ao Augusto por toda paciência e apoio, ensinando-me que coragem não é a ausência de medo, mas a capacidade de superá-lo.

As amigas da república, Ana Clara, Fernanda, Dâmaris e Luanne pela convivência, incentivo e por proporcionarem momentos renovadores.

A toda minha família que, embora distante fisicamente, soube me apoiar com manifestações de carinho e incentivo.

Aos meus amigos da vida inteira, que mesmo longe estão sempre comigo.

E, por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

A Deus, por tudo.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	4
3.1. Local de estudo e material biológico.....	4
3.2. Descrição do comportamento higiênico.....	5
3.3. Faixa etária das operárias envolvidas no processo de remoção de larvas mortas	6
3.4. Taxa de remoção e fatores bióticos e/ou abióticos.....	6
3.5. Análises de dados	8
4. RESULTADOS	10
4.1. Descrição do comportamento higiênico.....	10
4.2. Faixa etária das operárias envolvidas no processo de remoção de larvas mortas	12
4.3. Taxa de remoção e fatores bióticos e/ou abióticos.....	12
5. DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS	23
ANEXOS	27

RESUMO

GAVA, Mayla, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2016. **Comportamento Higiênico em *Plebeia lucii* Moure, 2004 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**. Orientador: Lúcio Antônio de Oliveira Campos.

O comportamento higiênico é uma adaptação essencial para a vida social. Em abelhas, ele é definido como a habilidade das abelhas detectarem, desopercularem e removerem a prole doente, parasitada ou morta em células de cria. Em Meliponini este comportamento pode ser um mecanismo importante na manutenção e sobrevivência das colônias, porém, poucos estudos sobre higiene das colônias foram realizados neste grupo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o comportamento higiênico em *Plebeia lucii*, descrevendo a sequência dos atos comportamentais e idade das operárias envolvidas no processo de limpeza e avaliando a influência de fatores climáticos bem como das condições internas da colônia sobre a taxa de remoção de larvas mortas. O experimento foi conduzido no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, no período de 14 de abril de 2015 a 04 de março de 2016. Larvas mortas pela técnica de “freezer-killing” foram introduzidas em duas colônias experimentais e a sequência de atos comportamentais foi observada por meio de filmagens. A taxa de remoção foi avaliada diariamente por meio da contagem direta do número de larvas removidas durante 10 dias em oito colônias experimentais. O comportamento higiênico é caracterizado sequencialmente pela pontuação da célula, destruição parcial da célula, remoção da larva morta e remoção dos restos de célula. A faixa etária das operárias envolvidas no processo de limpeza foi ampla. A taxa de remoção variou entre os experimentos quanto ao início do processo de limpeza e a quantidade de larva removida/dia. Fatores climáticos não influenciaram diretamente o comportamento higiênico e a taxa de remoção foi maior em colônias com maiores quantidades de alimento, resina, cria nova, cria velha e lixo. Por outro lado, os fatores abióticos influenciaram indiretamente no comportamento higiênico, considerando que afetam as condições internas da colônia. *P. lucii* apresenta comportamento higiênico efetivo, reforçando a existência deste mecanismo em Meliponini, o qual pode ter papel importante na prevenção de doenças neste grupo.

ABSTRACT

GAVA, Mayla, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2016. **Hygienic behavior in *Plebeia lucii* Moure, 2004 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**. Adviser: Lúcio Antônio de Oliveira Campos.

The hygienic behavior is an essential adaptation to social life. Among bees, it is defined as the ability of the bees to detect, detach and remove the sick offspring, parasitized or dead from the brood cells. In Meliponini this behavior can be an important mechanism for the maintenance and survivor of the hive, although, few studies about the hygiene of hives were done in this group. Thus, the goal of this work was to characterize the hygienic behavior in *Plebeia lucii*, describing the sequence of behavioral acts and the age of the workers involved in the cleaning process and evaluating the influence of climatic factors as well as the internal conditions of the colony on the removal rate of dead larvae. The experiment was conducted in the Central Apiary from the Federal University of Viçosa, between April 14th, 2015 to March 04th, 2016. The sequence of behavioral acts was observed by filming. Dead larvae were obtained through the technique of “freezer-killing” and were inserted in two experimental hives. The removal rate was assessed daily by direct count of the number of larvae removed for 10 days in eight experimental hives. The hygienic behavior is characterized sequentially through the cell’s punctuation, the partial destruction of the cell, removal of the dead larvae and removal of the cell’s remains. The age range of the workers involved in the cleaning process is broad. The removal rate varies between experiments as well the start of the cleaning process and the number of larvae removed daily. Climatic factors do not influence directly the hygienic behavior, and the removal rate was higher in hives with higher amounts of food, resin, new offspring, old offspring and waste. On the other hand, abiotic factors influenced indirectly on the hygienic behavior, considering that they affected the internal conditions of the hive. *P. lucii* has an effective hygienic behavior, which reinforces the existence of this mechanism in Meliponini; this may have an important role in the prevention of disease in this group.

1. INTRODUÇÃO

Insetos sociais são caracterizados por um sistema de divisão de trabalho no qual há cooperação entre os membros da colônia com relação ao cuidado com a cria, ocorrendo sobreposição de gerações (Wilson, 1971). Nestes insetos, a contaminação da colônia por agentes patogênicos pode ser uma ameaça, uma vez que a maioria dos patógenos é capaz de proliferar nas condições quentes e úmidas encontradas dentro do ninho (Diez *et al.*, 2012).

Dentro dos grupos de Hymenoptera sociais, há várias maneiras de descarte de indivíduos mortos, evitando contato prolongado entre os cadáveres e os indivíduos que vivem em uma colônia (Sun & Zhou, 2013). Esse comportamento é uma adaptação essencial para a vida social, mantendo a higiene em ninhos encerrados.

Algumas espécies de formigas são conhecidas por manter o interior de seu ninho limpo (Dumpert, 1978). Um estudo realizado por Diez (2014) mostrou que em colônias onde há a remoção de corpos mortos, a sobrevivência de operárias é maior. Em algumas espécies, os cadáveres são transportados para locais determinados, muitas vezes levados para fora do ninho e descartado em depósitos de lixo (Wilson *et al.*, 1958).

Em abelhas eussociais o comportamento higiênico é caracterizado pela habilidade das operárias em detectar, desopercular e remover a prole doente, parasitada ou morta das células de cria (Rothenbuhler, 1964 a-b). Colônias que realizam esse tipo de comportamento são menos afetadas por parasitas e doenças, os quais podem ter a sua proliferação favorecida pela decomposição de crias mortas dentro de colônias (revisado por Spivak & Gilliam, 1998 a-b).

Em *Apis mellifera* o comportamento higiênico tem sido amplamente estudado (Rothenbuhler, 1964 a-b; Spivak & Reuter 1998; Gramacho & Gonçalves 2009; Bigio *et al.*, 2013), considerando que este grupo é cosmopolita e de grande importância econômica, principalmente na produção de produtos apícolas e em serviços de polinização em áreas agrícolas (Spivak & Gilliam, 1998a). Nessa espécie os ninhos são construídos com favos

verticais e células hexagonais de ambos os lados, contendo alimento armazenado e cria, com reaproveitamento das células a cada geração (Roubik, 2006). Acredita-se que a necessidade de reaproveitar células tenha forçado o desenvolvimento de um sofisticado sistema de limpeza que caracteriza o comportamento higiênico neste gênero (Spivak & Gilliam 1993).

De modo geral este comportamento é influenciado pelas condições internas da colônia (Spivak & Gilliam, 1993) e por fatores climáticos (Message, 1979). Entretanto, acredita-se que a sua expressão seja determinada geneticamente (Rothenbuhler, 1964 a-b)

As abelhas sem-ferrão apresentam uma diversidade de arquiteturas de ninhos, com células de cria dispostas em favos horizontais, favos em espiral e ainda em cachos (Michener, 2007). A estrutura de armazenamento de alimentos neste grupo também difere do das *Apis*, sendo o néctar e o pólen armazenado em potes de cerume dispostos nas regiões periféricas do ninho. Além disso, as células de cria são destruídas após a emergência das abelhas adultas (Nogueira-Neto, 1997).

O comportamento higiênico em abelhas sem ferrão pode ser um mecanismo importante na manutenção e sobrevivência das colônias, porém estudos sobre esse comportamento em Meliponini se limitam às espécies *Melipona quadrifasciata* e *Tetragonisca angustula* (Tenório, 1996); *Melipona beecheii* e *Scaptotrigona pectoralis* (Medina *et al.*, 2009); e *Plebeia remota* (Nunes-Silva *et al.*, 2009), todas com células de cria dispostas em favos horizontais.

A abelha *Plebeia lucii* (Apidae: Meliponini), de ocorrência natural na região de Viçosa – MG, possui tamanho pequeno, são dóceis e de fácil manejo, suas colônias apresentam as células de cria individualizadas e construídas em forma de cachos (Moure, 2004). Dessa maneira, esta espécie pode ser um modelo para estudar o comportamento higiênico em abelhas sem ferrão que constroem ninhos em cachos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Propôs-se caracterizar o comportamento higiênico em *P. lucii*, respondendo as seguintes perguntas: qual a sequência dos atos comportamentais envolvidos no processo de remoção de larvas mortas? Qual a idade das operárias que participam de cada etapa da remoção? Como a taxa de remoção de larvas mortas varia ao longo do tempo? Como fatores bióticos e/ou abióticos influenciam no processo de remoção de larvas mortas?

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de estudo e material biológico

Esse estudo foi conduzido no Apiário Central do DDE da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil (20°45'30" S, 42°52'05"W, Altitude 649 m) no período de 14 de abril de 2015 a 04 de março de 2016. A região apresenta temperatura média mínima anual de 16,54°C e máxima de 28°C (INMET).

Foram utilizadas oito colônias de *P. lucii* em condições estruturais semelhante mantidas em caixas de criação e instaladas no Apiário Central da UFV. Os ninhos foram transferidos para caixas de madeira padronizadas de 15X15X7,5 cm e alocadas no interior de uma sala de observação durante todo o período de estudo. Para permitir as observações do comportamento das abelhas, as caixas receberam uma tampa de vidro e uma sobretampa de madeira que era retirada no período de observação. As caixas foram conectadas com o exterior por meio de um tubo de bambu que permitia que as abelhas forrageiras pudessem transitar livremente para ambiente externo. No fundo de cada caixa foram demarcadas duas arenas de mesmo tamanho, uma ao lado da outra, utilizadas no experimento de taxa de remoção de cria morta para separar o grupo morto do grupo controle (item 3.4) (Figura 1).

Para avaliar o comportamento de remoção de cria morta foram utilizadas células de cria com larvas do último instar larval (pré-defecante). Esta fase foi utilizada, por ser mais resistente ao manuseio e para evitar a emergência de abelhas do grupo controle durante a experimentação. As células de cria foram obtidas de colônias doadoras para evitar o enfraquecimento e perturbação nas colônias em estudo.

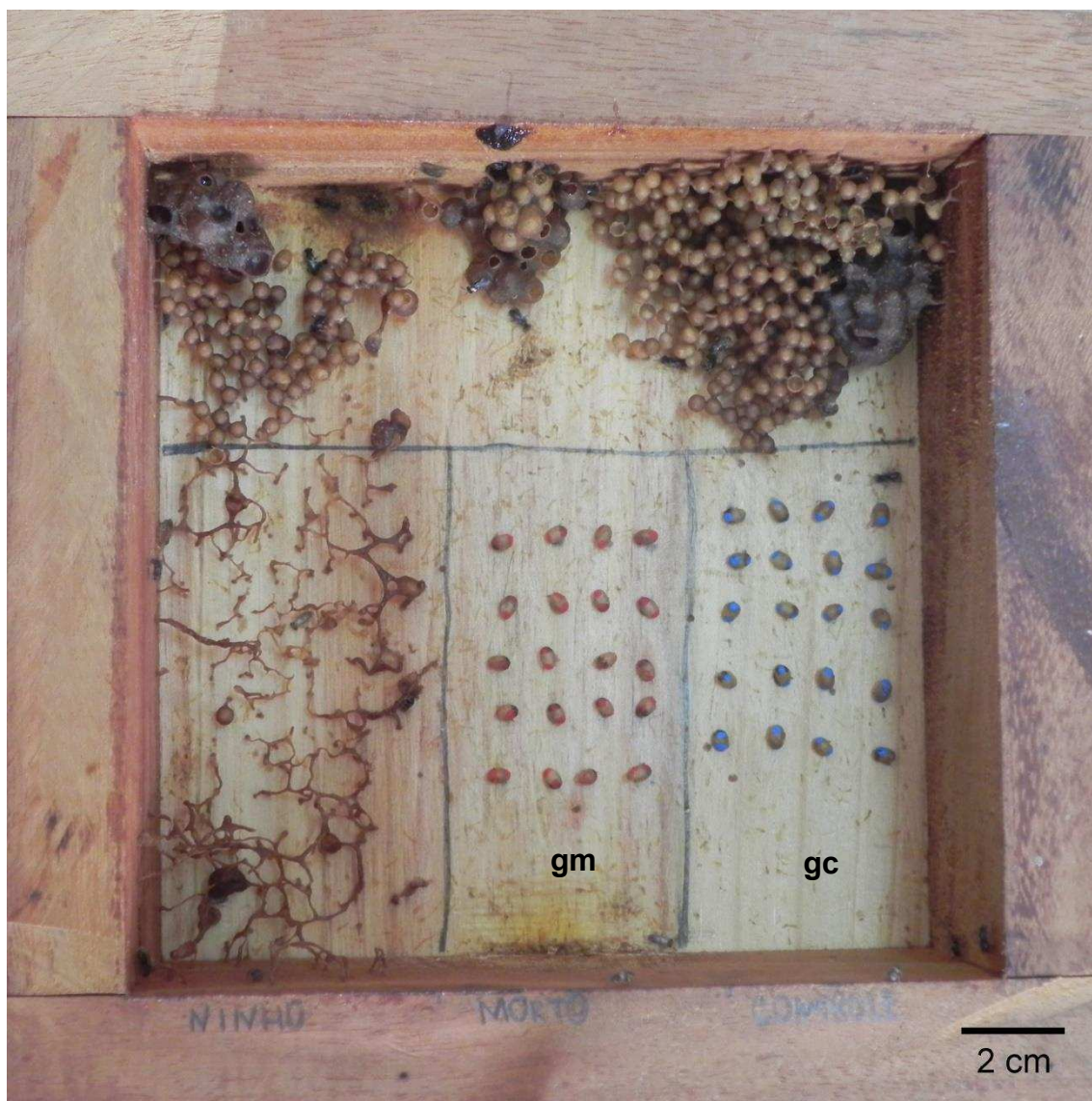


Figura 1 – Ninhos artificiais de *P. lucii* em caixas de madeira padronizadas, com duas arenas onde foram colocados os grupos morto (gm) e controle (gc).

3.2. Descrição do comportamento higiênico

Para descrever o comportamento de limpeza da espécie foram utilizadas duas colônias, nas quais foram introduzidas três células com larvas mortas por congelamento a -5°C por 24h e, em seguida, descongeladas em estufa B.O.D. a $26^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 1h (técnica “freezer-killing” Spivak & Downey, 1998). Imediatamente após o descongelamento, estas células, aqui denominadas de grupo morto, foram introduzidas nas colônias. Como grupo controle, células de cria provenientes das mesmas colônias doadoras foram mantidas em estufa

B.O.D. a $26^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h, sendo introduzidas nas colônias logo em seguida (Tenório, 1996).

As células do grupo morto foram pintadas com tinta guache (Acrilex®), vermelha, o grupo controle foi pintado de azul. Testes preliminares mostraram que a marcação das células com tinta vermelha ou azul não influenciaram o comportamento das abelhas (Anexo 1).

Os grupos de células mortas e controle foram expostos simultaneamente, no fundo de duas colônias e as interações das abelhas com essas células foram registradas continuamente por sete dias, utilizando uma webcam Logitech® HD 1080p, modelo c920 e o software Debut Video Capture®.

3.3. Faixa etária das operárias envolvidas no processo de remoção de larvas mortas

Para obtenção de adultos com idade conhecida, favos de cria foram retirados de colônias doadoras e acondicionados em estufa B.O.D. a $26^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Diariamente, cada abelha adulta recém-emergida foi marcada com tinta atóxica no mesossomo, com cor relacionada ao dia da emergência. Estas operárias foram introduzidas nas colônias experimentais logo no primeiro dia após a emergência e a interação delas com as células do grupo morto foi registrada, utilizando os mesmos registros videográficos descritos no item 3.2.

3.4. Taxa de remoção e fatores bióticos e/ou abióticos

Para avaliar a taxa de remoção da cria morta, foram feitos 48 experimentos descritos a seguir.

Em cada colônia experimental foi incluído um total de 40 células de cria, sendo 20 células do grupo controle e 20 células do grupo morto.

Após a introdução das células de cria mortas e do controle nas colônias experimentais, foi realizada a observação direta da remoção das células a cada 24 h durante um prazo consecutivo máximo de 10 dias. Diariamente foi avaliada a quantidade de larvas removidas pelas operárias.

Para avaliar se a taxa de remoção de larvas estava associada a fatores bióticos, levou-se em consideração a condição em que cada colônia experimental se encontrava. Foram analisadas imagens registradas no início de cada experimento. Cada foto, correspondente a uma área de aproximadamente 15X15 cm, foi colocada sob uma grade de 225 quadrados de 1X1 cm. A partir desta grade foi contabilizado o material encontrado de acordo com seguintes categorias: (1) cria nova, (2) cria velha, (3) alimento, (4) lixo e (5) resina. O número de quadrados de cada categoria foi utilizado para estimar as porcentagens dos componentes nas colônias em relação ao volume (Figura 2).

A fim de avaliar o efeito dos fatores abióticos externos sobre o comportamento higiênico, a taxa de remoção foi correlacionada com temperatura média (°C), umidade relativa (%), precipitação (mm), intensidade de chuva (mm/h) e brilho solar (horas de luz). Estes dados climáticos correspondentes à região de Viçosa, durante os experimentos, foram obtidos na Estação Climatológica Principal de Viçosa – INMET/Departamento de Engenharia Agrícola/UFV.

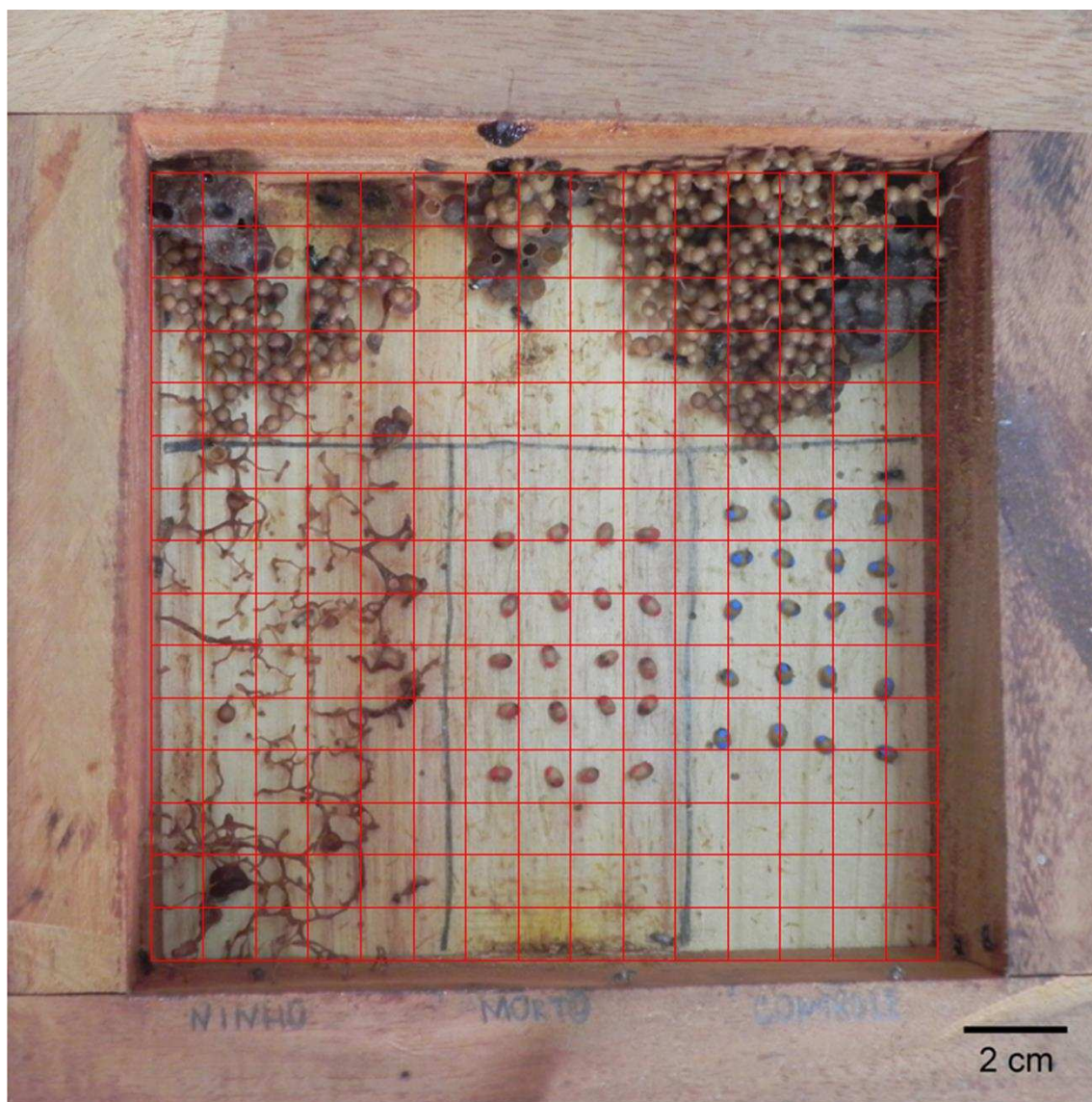


Figura 2 – Ninhos artificiais de *P. lucii* em caixas de madeira padronizadas, com grade para avaliação da condição estrutural do ninho.

3.5. Análise de dados

Para comparar o número médio de larvas removidas entre o grupo morto e o controle, os dados foram submetidos ao teste t não pareado ao nível de 5 % de significância.

Para identificar o padrão de remoção de cria morta, durante 10 dias consecutivos, foi utilizada a regressão polinomial. Especificamente, cada experimento foi ajustado a um modelo linear, quadrático ou cúbico. Além disso, modelos de regressão múltipla (stepwise) foram utilizados para verificar a

relação entre fatores abióticos (temperatura, umidade, precipitação, intensidade de chuva e brilho solar) e a taxa de remoção da larva/dia.

Para testar se os componentes da colônia (quantidade de cria nova, cria velha, alimento, lixo e resina) explicam os padrões de remoção de cria morta (linear, quadrático e cúbico) foi utilizada uma análise de componentes principais (ACP).

Essas análises foram feitas com 40 experimentos (de um total de 48), pois foram excluídos aqueles com taxa de remoção de larva muito baixa (menos que três larvas removidas ao final do experimento).

A análise estatística foi realizada com o aplicativo GENES (Cruz, 2013) versão 2015. O nível de significância foi previamente fixado em 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Descrição do comportamento higiênico

Ao todo, foram obtidas 336 horas de registros comportamentais. Todas as células observadas (grupo morto e controle, $n = 12$) foram frequentemente inspecionadas pelas operárias, utilizando as antenas e língua (Figura 3A). Considerou-se o início do comportamento higiênico quando uma abelha criava o primeiro orifício na célula, o que foi denominado de pontuação (Figura 3B) (Pereira, 2008). Apenas células do grupo morto foram pontuadas em 83,3% (5 de um total de 6 células), sugerindo que este seja o início do processo de limpeza. A pontuação iniciou-se a cerca de $77,27 \pm 21,57$ (50,28 - 105,22) horas após a introdução das células do grupo morto nas colônias. Especificamente, uma mesma operária, utilizando as mandíbulas, mordia a parte superior ou lateral da célula até produzir o primeiro orifício. Abelhas inspecionaram com as antenas tanto a superfície externa (119 vezes), quanto o interior das células pontuadas (20 vezes), através do orifício criado.

A remoção do cerume pelas operárias foi observada 277 vezes. Quando aproximadamente, metade do cerume de uma célula havia sido removida (Figura 3C), o que ocorreu em $42,07 \pm 32,09$ (5,4 - 85,0) horas após a pontuação, as operárias iniciaram a remoção da larva morta. Essa remoção ocorreu predominantemente de forma gradual (Figura 3D), isto é, abelhas retiravam uma pequena porção do corpo da larva até sua completa remoção da célula. Contudo, houve um caso em que uma operária removeu uma larva inteira de uma única vez. Esta larva foi encontrada posteriormente no lixo da colônia. Ao mesmo tempo em que abelhas removeram a larva morta (202 vezes), elas também removeram o restante de cerume da célula (98 vezes), que também era depositada no lixo (Figura 3E). A remoção da larva, juntamente com o cerume restante na célula ocorreu em $12,96 \pm 9,13$ (0,72 - 22,73) horas. Ao total, o processo de limpeza, iniciado com a pontuação da célula e finalizado com a total remoção da larva morta (Figura 3F), durou em media $55,6 \pm 33,8$ (17,6 - 106) horas (Anexo 2).

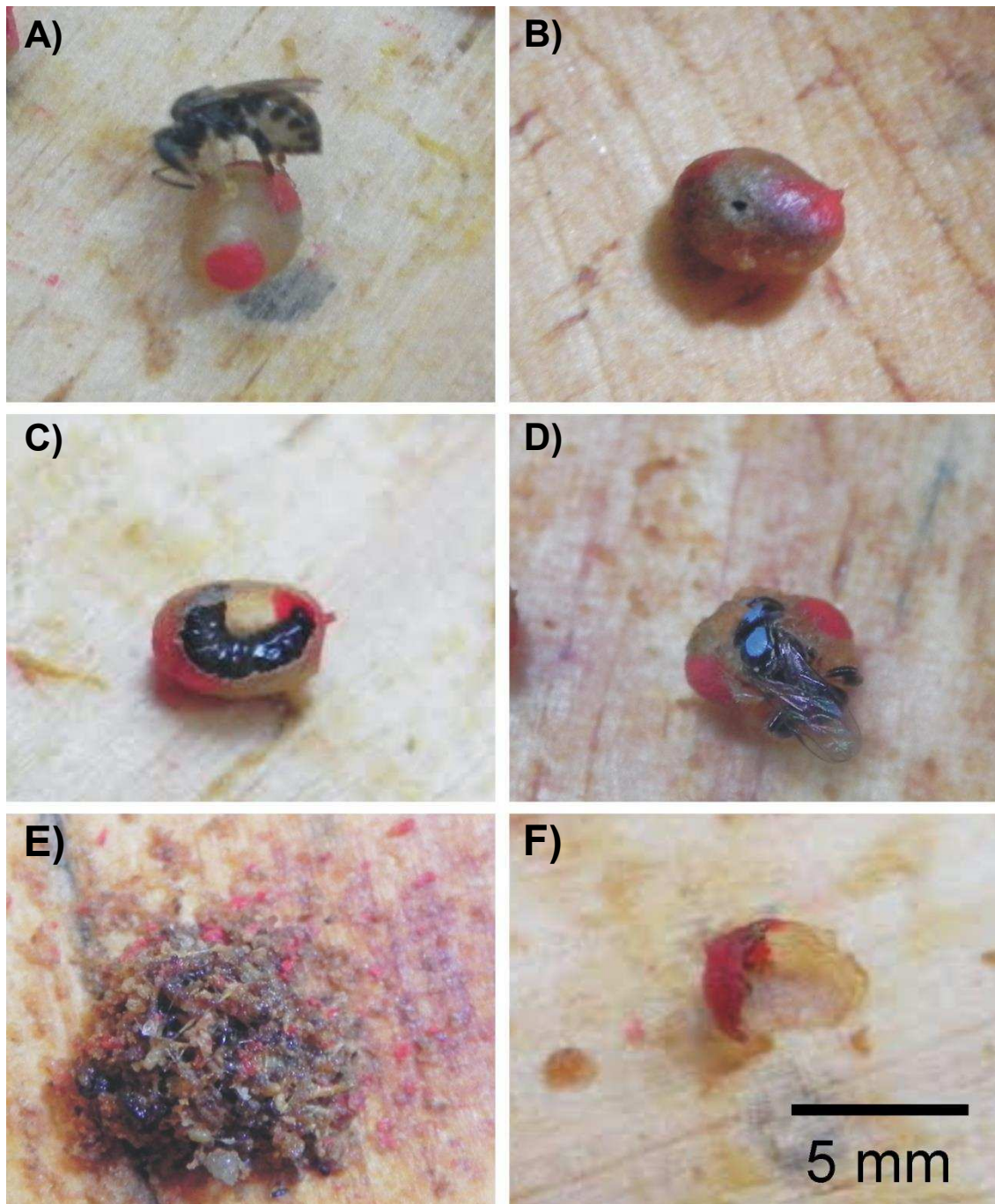


Figura 3 – Registros do comportamento higiênico de *Plebeia lucii*. **A)** operárias inspecionando as células do grupo morto com as antenas e língua; **B)** célula pontuada (início do comportamento higiênico); **C)** célula com metade do cerume removido pelas operárias; **D)** operária removendo a larva morta; **E)** lixo contendo restos de cerume e larva morta; **F)** célula sem a larva morta com a maioria do cerume removida (final do processo de limpeza).

4.2. Faixa etária das operárias envolvidas no processo de remoção de larvas mortas

Um total de 848 operárias, com idade conhecida, foi introduzido em duas colônias, que foram observadas continuamente por 336h. Dos 716 eventos observados, 140 (19,55%) foram realizados por essas abelhas (marcadas com tinta ao nascerem).

Foram observadas operárias de 3 e 11 dias de idade realizando pontuação da célula. Abelhas de 2 a 13 dias de idade inspecionavam com as antenas tanto a superfície, quanto o interior das células pontuadas.

A remoção de cerume da célula foi realizada por operárias de 2 a 13 dias de idade. Entre as abelhas que realizaram a remoção de cria, havia operárias de 9, 11 e 13 dias de idade.

4.3. Taxa de remoção e fatores bióticos e/ou abióticos

A taxa de remoção de larvas do grupo controle $0,27 \pm 0,78$ (0 - 3) em todos os 40 experimentos foi significativamente menor se comparada ao grupo morto $13,92 \pm 4,90$ (3 - 20).

O comportamento de remoção das larvas variou entre os 40 experimentos: 14/40 se ajustaram a uma função linear, 13/40 a uma função quadrática e 13/40 a uma função cúbica (Anexo 3). Esta diferença permitiu a divisão dos experimentos em três grupos com base nos modelos de regressão ajustados. Nos experimentos ajustados a função linear (Grupo 1), a remoção larva/dia foi progressiva, ou seja, a partir da detecção de larva morta à remoção dos cadáveres, ocorreu diariamente sem nenhuma pausa. O percentual acumulado de larva removida foi em média $58,57 \pm 26,12$ (15 - 100) % (Figura 4A).

Nos experimentos com taxa remoção ajustados ao modelo quadrático (Grupo 2), a detecção dos cadáveres foi rápida e a remoção larva/dia foi muito acentuada nos primeiros dias, havendo um pico de atividade no início e depois um decréscimo. O percentual médio de larvas removidas ao longo do experimento foi de $75,38 \pm 22,12$ (40 - 100) % (Figura 4B). O início do processo de limpeza foi mais demorado nos experimentos com ajuste de função cúbica

(Grupo 3). A taxa de remoção foi progressiva e ao final apresentou uma leve queda. O percentual acumulado de larvas removidas foi em média $75,77 \pm 22,53$ (35 - 100) % (Figura 4C). Considerando todos os experimentos, a taxa de remoção de larva foi $69,63 \pm 24,53$ (15 - 100) %.

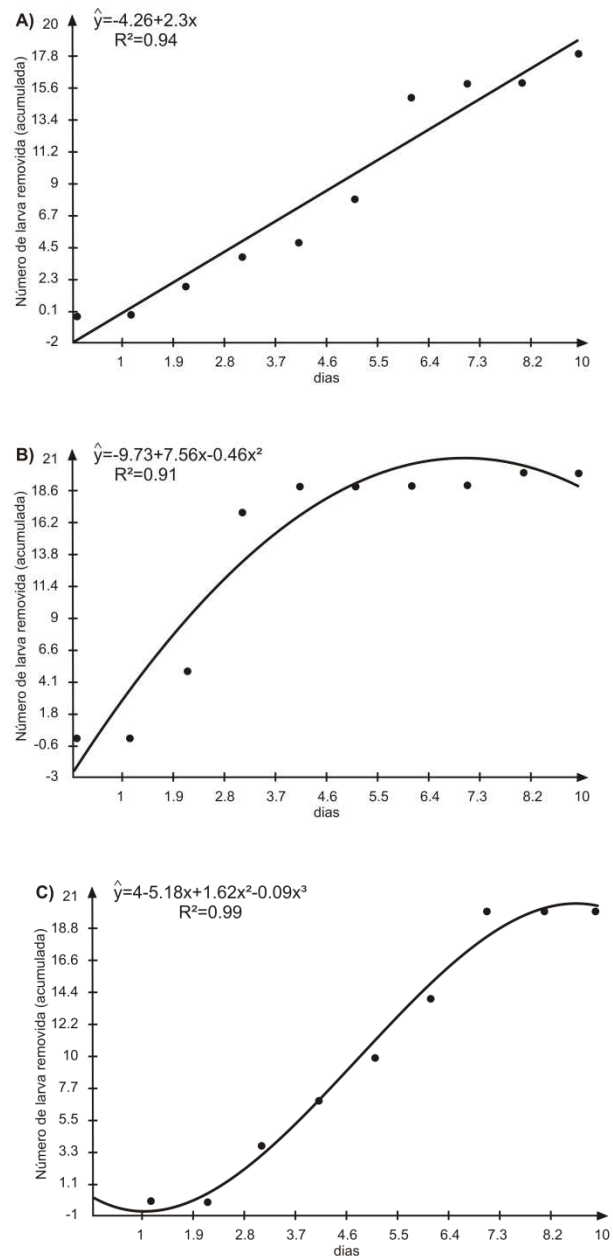


Figura 4 – Número de larvas removidas acumulado ao longo de 10 dias. **A)** exemplo de experimento com taxa de remoção ajustado a função linear (experimento 20); **B)** exemplo de experimento com taxa de remoção ajustado a função quadrática (experimento 35); **C)** exemplo de experimento com taxa de remoção ajustado a função cúbica (experimento 15).

Pela análise de componentes principais é possível verificar que a influência dos fatores bióticos sobre a taxa de remoção é similar entre os três grupos (agrupamentos com base no modelo de regressão ajustado para taxa de remoção) (Figuras 5 A-B). A tabela 1 mostra como as diferentes variáveis contribuem para os componentes principais (CP's). A variação retida pelos três primeiros componentes principais foi de 87,76 % [38,40% (CP1) + 27,23% (CP2) + 22,11% (CP3)].

A contribuição das variáveis (fatores bióticos) para CP1 diferiram bastante, com maior peso para as variáveis quantidade de alimento armazenado e quantidade de resina. A taxa de remoção tende a ser maior em colônias com mais alimento e resina. O segundo CP é fortemente influenciado pela quantidade de cria velha, isto é, quanto maior a sua quantidade, maior a taxa de remoção. As variáveis de maior peso para CP3 foram quantidade de cria nova e quantidade de lixo depositado, os quais estão positivamente correlacionados com o comportamento de limpeza (Tabela 1).

Tabela 1 – Componentes principais e peso das variáveis internas da colônia (fatores bióticos).

	Cria nova	Cria velha	Alimento	Lixo	Resina
CP1	-0,0243	0,2342	0,6567	-0,286	0,6569
CP2	0,5349	-0,7256	-0,0873	-0,3717	0,2039
CP3	0,6682	0,1195	0,2458	0,691	0,0372
CP4	-0,5152	-0,5927	0,1467	0,5335	0,2778
CP5	0,0375	0,2305	-0,6922	0,134	0,6696

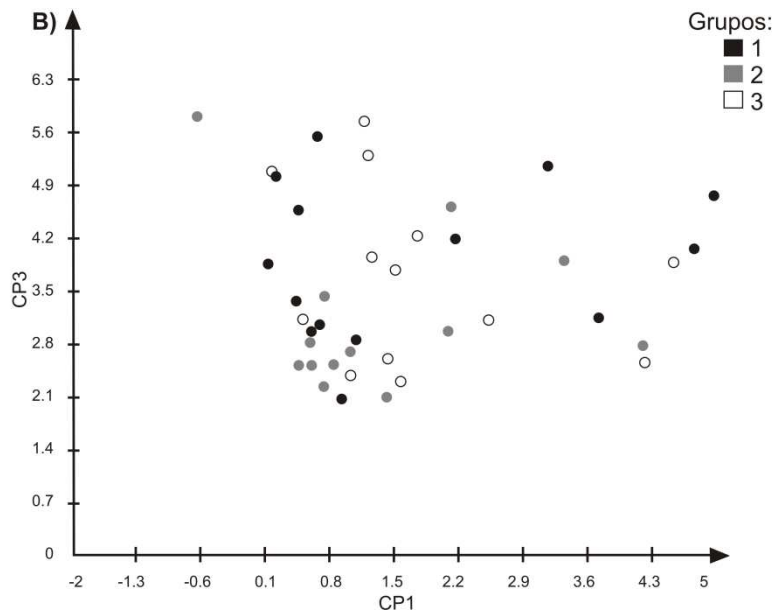
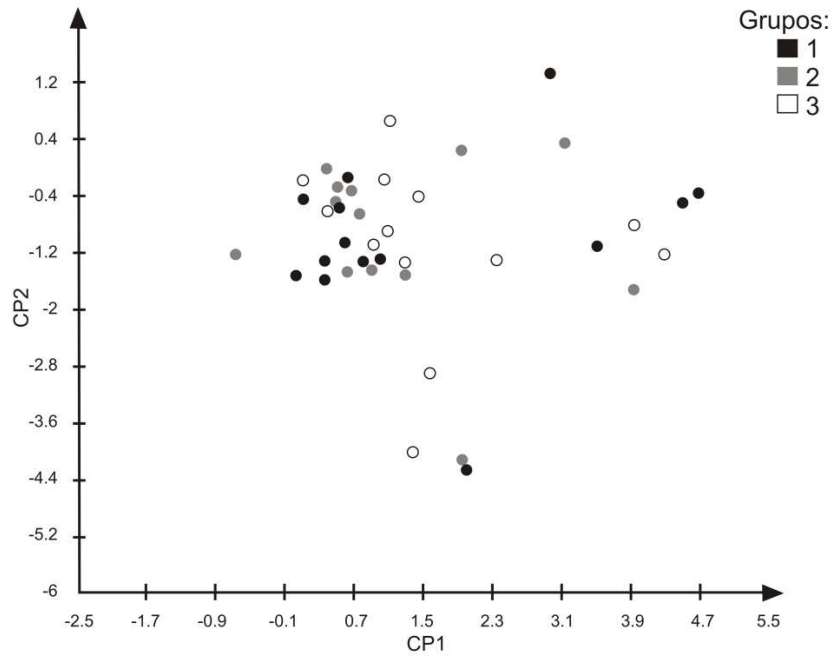


Figura 5 – Dispersão gráfica dos dados de componentes principais: **A)** CP1 e CP2; **B)** CP1 e CP3. Experimentos ajustados a função linear (grupo 1), função quadrática (grupo 2) e função cúbica (grupo 3).

A taxa de remoção de larvas foi inconsistentemente correlacionada com fatores abióticos. Em apenas nove dos 40 experimentos, a taxa de remoção de larvas foi correlacionada com a temperatura (3/40 experimentos), brilho solar (3/40), precipitação (2/40) e temperatura + intensidade de chuva (1/40) (Anexo 4).

5. DISCUSSÃO

Os resultados mostram claramente que operárias de *P. lucii* são capazes de detectar cria morta e removê-las, o que caracteriza a existência de comportamento higiênico nesta espécie.

As células do grupo morto e controle foram inspecionadas pelas operárias, as quais caminhavam sobre as células de cria, utilizando as antenas e a língua antes de iniciarem os comportamentos de abertura das células e remoção da cria morta. Os resultados mostram que o tempo médio dispensado nessa tarefa foi relativamente maior em *P. lucii* do que em outras espécies de abelhas sem ferrão como: *Plebeia remota*, *Scaptotrigona pectoralis*, *Melipona beecheii*, *Melipona quadrifasciata*, *Tetragonisca angustula* e em *A. mellifera* (Nunes-Silva *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2009; Tenório, 1996; Bigio, 2014). Destaca-se que neste estudo apenas as células do grupo morto foram pontuadas e removidas.

A percepção mais tardia das células de cria morta pelas operárias de *P. lucii* pode estar relacionada ao tamanho das operárias, já que estas são relativamente pequenas (0,03cm) (Moure, 2004). De acordo com Johnson & Howard (1987) espécies menores apresentam proporcionalmente menos sensilas antenais que espécies maiores. Neste sentido, a quantidade de órgãos sensoriais presente em antenas de *P. lucii* pode ser inferior ao de outras espécies de porte maior. Estas sensilas são importantes na detecção de odores, vibrações, e diferenças de temperatura (Klowden, 2013), entretanto, no presente estudo não foi avaliado o tipo de sinalização emitido pela cria morta que permitiria a sua identificação pelas operárias. Em *A. mellifera*, Gramacho & Gonçalves (2000) observaram que fatores físicos e químicos estão relacionados com a detecção da cria morta, por exemplo, (i) os odores exalados pela larva morta (ii) a ausência de vibração da cria dentro das células e (iii) a diferença da temperatura entre as células com larvas vivas. A percepção desses fatores está relacionada aos diferentes tipos de sensilas presentes nas antenas das abelhas (Cruz-Landim, 2009).

As colônias de *P. lucii* apresentam as células de cria individualizadas e construídas em forma de cacho (Moure, 2004). A remoção de larvas neste tipo de células é demorada, pois não há um ponto definido por onde ela possa ser retirada, o que leva à destruição de pelo menos metade da célula. Conseqüentemente, o tempo total de remoção da cria morta em *P. lucii* foi muito superior ao observado em outras espécies de Meliponini (Nunes-Silva *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2009; Tenório, 1996). Por exemplo, operárias de *P. remota* removeram em torno de 96% da cria morta nas primeiras 48h (Nunes-Silva *et al.*, 2009). Em *S. pectoralis* e *M. beecheii* a remoção total ocorreu dentro de 72h e 216 h respectivamente (Medina *et al.*, 2009). Em *M. quadrifasciata* e *T. angustula* a remoção de larvas em período de alimentação chegou a 100% para ambas as espécies em 24 h (Tenório, 1996). Em *A. mellifera* há diferença na taxa de remoção entre linhagens diferentes. Tenório (1996) observou em abelhas africanizadas quase 100% da remoção da cria morta em 24h, porém em abelhas europeias a média de remoção encontrada por Bigio (2014) foi de 64,3% em 48h. Nessas espécies, as células de crias estão agrupadas em favos horizontais ou verticais, com células hexagonais dispostas lado a lado nos quais há um opérculo, cuja retirada é suficiente para permitir a remoção da larva morta (Nogueira-Neto, 1997; Michener, 2007).

A pintura das células com crias mortas permitiu a identificação de restos destas no lixo das colônias, indicando que há pouco ou nenhum reaproveitamento do cerume na construção de novas células. O comportamento de destruição das células é comum em abelhas sem ferrão após a emergência da cria (Wille, 1983; Roubik, 2006; Michener 2013) e poderia atuar como uma medida profilática, explicando baixo registro de doenças em abelhas sem ferrão (Medina *et al.*, 2009). As etapas do comportamento higiênico em *A. mellifera* diferem do analisado em *P. lucii*. Gramacho & Gonçalves (2001; 2009) observaram que a higiene dos favos em *Apis* se dá apenas pela pontuação e desoperculação da célula, com o reaproveitamento final dos favos. Para Spivak & Gilliam (1993), essa reutilização das células reflete no comportamento higiênico aprimorado deste grupo.

As operárias de *P. lucii* removeram as larvas na maior parte das vezes gradualmente, dilacerando-as em pequenas partes até sua completa remoção. A observação do lixo da colônia permitiu a identificação de pequenos fragmentos de abelhas, embora a quantidade deste material fosse inferior ao que foi removido pelas operárias. A divisão da cria morta em pequenos fragmentos poderia facilitar o transporte da larva nas situações em que elas seriam descartadas. As espécies *T. angustula* e *M. beecheii* depositam as larvas mortas temporariamente no lixo para serem descartadas para fora da colônia posteriormente, contudo essas espécies não as dilaceram (Tenório, 1996; Medina *et al.*, 2014). Por outro lado, a presença de poucas larvas no lixo levanta a hipótese de que parte dos restos larvais seja ingerida pelas operárias. O canibalismo durante o comportamento higiênico é raro em abelhas sem ferrão, embora seja comum o consumo de ovos de operárias pela rainha durante o processo de oviposição (Tóth *et al.*, 2002; Tóth *et al.*, 2004). Em *A. mellifera* foi observado canibalismo durante o comportamento higiênico (Message, 1979; Pereira, 2008; Gramacho e Gonçalves, 2009) e quando há produção de machos diploides pelas colônias (Herrmann *et al.*, 2005). Em outras espécies de Meliponini, *M. quadrifasciata* e *T. angustula*, foi observado que as operárias retiram cautelosamente as crias mortas das células, evitando o rompimento do tegumento, porém a autora afirma que essas espécies não se alimentam das larvas removidas (Tenório, 1996).

Embora tenha sido introduzida uma grande quantidade de abelhas, o número de operárias marcadas executando as etapas do comportamento higiênico foi reduzido, o que pode ser compensado pelo tempo destinado a este tipo de atividade, já que em *P. lucii*, a faixa etária das operárias envolvidas na limpeza foi ampla. Abelhas jovens, em sua maioria, realizaram o trabalho de limpeza. De modo geral, em Meliponini, operárias mais jovens se ocupam com atividades ao redor da região de cria (Van Benthem, 1995; Hammel *et al.*, 2016). Dentro da faixa etária observada, na qual as abelhas realizam o comportamento higiênico, foi possível verificar uma subdivisão de tarefas. As atividades de inspeção, pontuação e remoção de célula foi realizada por operárias mais jovens; entretanto, a remoção de larvas é feita por abelhas mais velhas. Uma possível explicação para esta divisão é que abelhas mais velhas

estariam mais preparadas para lidar com larvas mortas, considerando que processo de esclerotização se completa à medida que as operárias se tornam forrageiras (Elias-Neto *et al.*, 2013). O tegumento é uma importante barreira à entrada e microorganismos (Diez *et al.*, 2012), além de constituir o suporte físico das abelhas (Cruz-Landim, 2009).

A análise de regressão permitiu a divisão dos experimentos em três grupos com base no modelo ajustado, entre os quais houve diferenças quanto ao início do processo de limpeza e a quantidade de larva removida/dia. No grupo 1 (linear) e grupo 2 (quadrático), a rápida detecção é um aspecto importante, já que o quanto antes for feita, mais rápida será remoção. Entretanto, a remoção mais lenta no modelo linear, comparada ao quadrático, proporciona um tempo maior de exposição às larvas mortas, o que pode ser prejudicial à colônia. Por outro lado, quanto mais rápida for a remoção, menor será o tempo de exposição e conseqüentemente o risco de alguma contaminação por parte da cria morta. Com relação ao grupo 3 (cúbico), a detecção demorada influenciou negativamente no tempo total de limpeza.

Os resultados mostram que a taxa de remoção foi maior em colônias com valores maiores para as cinco variáveis estudadas: quantidade de cria nova, quantidade de cria velha, quantidade de alimento armazenado, quantidade de resina armazenada e quantidade de lixo estocado. As variáveis quantidade de alimento e quantidade de resina são as mais importantes, seguidas de quantidade de cria velha, quantidade de cria nova e lixo estocado. Colônias com maiores quantidades de alimento e resina tendem a ser mais forte, o que poderia explicar a maior taxa de remoção, já que o volume de resíduos é maior e também o número de operárias trabalhando. Diferentemente, Nunes-Silva *et al.* (2009), estudando o comportamento higiênico em colônias fortes, médias e fracas de *P. remota*, verificaram que o estado da colônia não influencia o comportamento de limpeza; entretanto as observações foram realizadas no período de um mês, o que poderia ser insuficiente para capturar variações comportamentais dentro de uma mesma colônia.

A presença de muita cria nova e velha na colônia indica intensa atividade de postura da rainha, o que pode influenciar o ritmo de atividades dentro da colônia (Roubik, 2006), inclusive a remoção de cria morta, já que esta limpeza possibilitaria um ambiente maior e mais adequado à construção de novas células de cria. Em *A. mellifera* existe uma correlação positiva entre o aumento da eficiência do comportamento higiênico e o aumento na postura da rainha. O aumento da postura estimula a desoperculação e limpeza de células para dar lugar aos ovos ou estocagem de mel (Message, 1979).

Uma maior quantidade de lixo em colônias com alta taxa de remoção indica que grande parte do material retirado pelas operárias, principalmente restos de cerume, é depositada neste lixo, inclusive as larvas mortas, as quais também podem ser ingeridas. Entretanto não foi possível verificar por quanto tempo este material permanece armazenado no interior do ninho antes de ser descartado no exterior da colônia. Van Benthem *et al.* (1995) observaram que em *P. remota* os materiais de descarte são inicialmente armazenados em um ponto da colônia e posteriormente lançados externamente próximo ao orifício de entrada do ninho. O tempo que o lixo fica armazenado no interior do ninho é um fator importante para o estado sanitário da colônia, já que um tempo maior proporciona aumento da exposição das operárias ao material em decomposição, o qual poderia atuar como fonte de contaminação.

Os fatores climáticos tiveram pouca influência direta sobre a taxa de remoção da cria morta. Em *A. mellifera*, o comportamento higiênico é diretamente afetado pelas condições climáticas, já que as larvas mortas, quando não ingeridas, são lançadas imediatamente para fora da colônia, o que caracteriza uma atividade externa, a qual depende diretamente das condições do clima (Message & Gonçalves, 1980; Bugalho, 2009). Diferentemente, em *P. lucii* o comportamento de limpeza não depende diretamente da atividade externa, uma vez que esta espécie não lança o material removido imediatamente para fora da colônia, conforme se observa em *A. mellifera*. Por outro lado, as condições climáticas influenciam indiretamente no comportamento higiênico, considerando que afetam as condições internas da colônia (Teixeira & Campos, 2005) por regularem a atividade de voo, da qual depende todo o suprimento da colônia para construção de novas células de

cria e potes de armazenamento, variáveis estas que estão correlacionadas com a taxa de remoção.

Neste estudo, o comportamento higiênico em *P.Lucii* foi influenciado diretamente pelas condições internas da colônia e indiretamente por fatores ambientais. Entretanto, como ocorre em *A. mellifera* (Rothenbuhler, 1964 a-b), acredita-se que a base deste comportamento seja genética, o que poderia explicar a grande variação de comportamento entre colônias. Já a variação comportamental dentro de uma mesma colônia pode estar relacionada ao tempo que o experimento foi realizado. Diferente de outros trabalhos com Meliponini (Nunes-Silva *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2009) o presente estudo foi realizado durante quase um ano, e nesse período a condição estrutural do ninho variou, o que pode ter afetado o comportamento higiênico, já que este é influenciado por fatores bióticos.

6. CONCLUSÃO

- O comportamento higiênico nas colônias de *P. lucii* é caracterizado sequencialmente pela pontuação da célula, destruição parcial da célula, remoção da larva morta e remoção dos restos de célula;

- A faixa etária das operárias realizando o comportamento higiênico foi ampla. A pontuação e remoção de célula foi realizada por operárias com idade média de $7 \pm 3,36$ dias (2-13); na remoção de larvas a idade foi de $10 \pm 1,48$ dias (9-13);

- A taxa de remoção variou entre os experimentos quanto ao início do processo de limpeza e a quantidade de larva removida/dia;

- Fatores climáticos não influenciaram diretamente o comportamento higiênico;

- A taxa de remoção foi maior em colônias com maiores quantidades de alimento, resina, cria nova, cria velha e lixo.

REFERÊNCIAS

Bigio, G., Al Toufailia, H., & Ratnieks, F. L. W. (2014). Honey bee hygienic behaviour does not incur a cost via removal of healthy brood. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(1), 226-230.

Bigio, G., Schürch, R., & Ratnieks, F. L. (2013). Hygienic Behavior in Honey Bees (Hymenoptera: Apidae): Effects of Brood, Food, and Time of the Year. *Journal of Economic Entomology*, 106(6), 2280-2285.

Bugalho, V. D. A. (2009). Influência das precipitações pluviométricas e da atividade forrageira das abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) no comportamento higiênico (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). 108p.

Cruz Landim, C. (2009). *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. Editora UNESP, 408p.

Cruz, C. D. (2013). Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 35(3), 271-276.

Diez, L., Deneubourg, J. L., & Detrain, C. (2012). Social prophylaxis through distant corpse removal in ants. *Naturwissenschaften*, 99(10), 833-842.

Diez, L., Lejeune, P., & Detrain, C. (2014). Keep the nest clean: survival advantages of corpse removal in ants. *Biology Letters*, 10(7), 03-06.

Dumpert, K. (1981). *The social biology of ants*. Pitman Publishing Ltd, 289p.

Elias-Neto, M., Nascimento, A. L., Bonetti, A. M., Nascimento, F. S., Mateus, S., Garófalo, C. A., & Bitondi, M. M. (2014). Heterochrony of cuticular differentiation in eusocial corbiculate bees. *Apidologie*, 45(4), 397-408.

Gramacho, K. P., & Gonçalves, L. S. (2000). Fatores que interferem nas atividades de abelhas *Apis mellifera* relacionadas ao comportamento higiênico. In: 4º Encontro sobre abelhas, 4, 58-65.

Gramacho, K. P., & Gonçalves, L. S. (2001). The sequences of the hygienic behavior process of carniolan worker honey bees (*Apis mellifera carnica*). 37° *International Apicultural Congress*, 37.

Gramacho, K. P., & Gonçalves, L. S. (2009). Comparative study of the hygienic behavior of Carniolan and Africanized honey bees directed towards grouped versus isolated dead brood cells. *Genetics and Molecular Research*, 8(2), 744-750.

Hammel, B., Vollet-Neto, A., Menezes, C., Nascimento, F. S., Engels, W., & Grüter, C. (2016). Soldiers in a stingless bee: Work rate and task repertoire suggest they are an elite force. *The American Naturalist*, 187(1), 120-129.

Herrmann, M., Trenzcek, T., Fahrenhorst, H., & Engels, W. (2005). Characters that differ between diploid and haploid honey bee (*Apis mellifera*) drones. *Genetics and Molecular Research*, 4(4), 624-641.

Johnson, L. K., & Howard, J. J. (1987). Olfactory disc number in bees of different sizes and ways of life (Apidae: Meliponinae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 60(3), 380-388.

Klowden, M. J. (2013). *Physiological systems in insects*. Academic Press. 699 p.

Medina, L. M., Hart, A. G., & Ratnieks, F. L. W. (2009). Hygienic behavior in the stingless bees *Melipona beecheii* and *Scaptotrigona pectoralis* (Hymenoptera: Meliponini). *Genetics and Molecular Reserch*, 8 (2), 571-576.

Message, D. (1979). *Efeito de condições ambientais no comportamento higiênico em abelhas africanizadas Apis mellifera* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). 129 p.

Message, D., & Gonçalves, L. S. (1980). Efeitos da condições climáticas e da colônia no comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera*. In: 5° *Congresso brasileiro de Apicultura e 3° Congresso latino-ibero-americano de apicultura*, 5, 140-143.

Michener, C. D. (2007). *The bees of the world*. Johns Hopkins University Press. 913p.

Michener, C.D. (2013). *The Meliponini*. In: Vit, P., Pedro, S.R.M. & Roubik, D.W. (Eds.), *Pot-honey: a legacy of stingless bees* (pp. 3-17). Springer. 175 p.

Moure, J. S. (2004). Duas espécies novas de *Plebeia Schwarz* do Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 48(2), 199-202.

Nogueira-Neto, P. (1997). *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. Editora Nogueirapis, 446 p.

Nunes-Silva, P., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Gonçalves, L. S. (2009). Hygienic behavior of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). *Genetics and Molecular Research*, 8(2), 649-654.

Pereira, R. A. (2008). Monitoramento das atividades individuais de abelhas africanizadas relacionadas ao comportamento higiênico (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). 121p.

Rothenbuhler, W. C. (1964a). Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. *Animal Behaviour*, 12(4), 578-583.

Rothenbuhler, W. C. (1964b). Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killed brood. *American Zoologist*, 111-123.

Roubik, D. W. (2006). Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37(2), 124-143.

Spivak, M., & Downey, D. L. (1998). Field assays for hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 91(1), 64-70.

Spivak, M., & Gilliam, M. (1993). Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. *Journal of Apicultural Research*, 32(3-4), 147-157.

Spivak, M., & Gilliam, M. (1998a). Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and *Varroa*: Part I. Studies on hygienic behaviour since the Rothenbuhler. *Bee world*, 79(4), 124-134.

Spivak, M., & Gilliam, M. (1998b). Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and *Varroa*: Part II. Studies on hygienic behaviour since the Rothenbuhler. *Bee world*, 79(4), 169-186.

Spivak, M., & Reuter, G. S. (1998). Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie*, 29 (3), 291-302.

Sun, Q., & Zhou, X. (2013). Corpse management in social insects. *International Journal of Biological Sciences*, 9(3), 313-321.

Teixeira, L. V., & Campos, F. D. N. M. (2009). Início da atividade de vôo em abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae): influência do tamanho da abelha e da temperatura ambiente. *Revista Brasileira de Zootecias*, 7(2), 195-202.

Tenório, E. G. (1996). Comportamento higiênico em abelhas indígenas (*Melipona quadrifasciata* Lepeltier, 1836 e *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811) e abelhas africanizadas (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) (Doctoral dissertation, Universidade Federal de Viçosa.). 54p.

Tóth, E., Queller, D. C., Dollin, A., & Strassmann, J. E. (2004). Conflict over male parentage in stingless bees. *Insectes Sociaux*, 51(1), 1-11.

Tóth, E., Queller, D. C., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Strassmann, J. E. (2002). Genetic and behavioral conflict over male production between workers and queens in the stingless bee *Paratrigona subnuda*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 53(1), 1-8.

Van Benthem, F. D. J., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Velthuis, H. H. W. (1995). Biology of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg): observations and evolutionary implications. *Insectes sociaux*, 42(1), 71-87.

Wille, A. (1983). Biology of the stingless bees. *Annual Review of Entomology*, 28(1), 41-64.

Wilson, E. O. (1971). The insect societies. Massachusetts. Harvard University Press, 548 p

Wilson, E. O., Durlach, N. I., & Roth, L. M. (1958). Chemical releasers of necrophoric behavior in ants. *Psyche*, 65(4), 108-114.

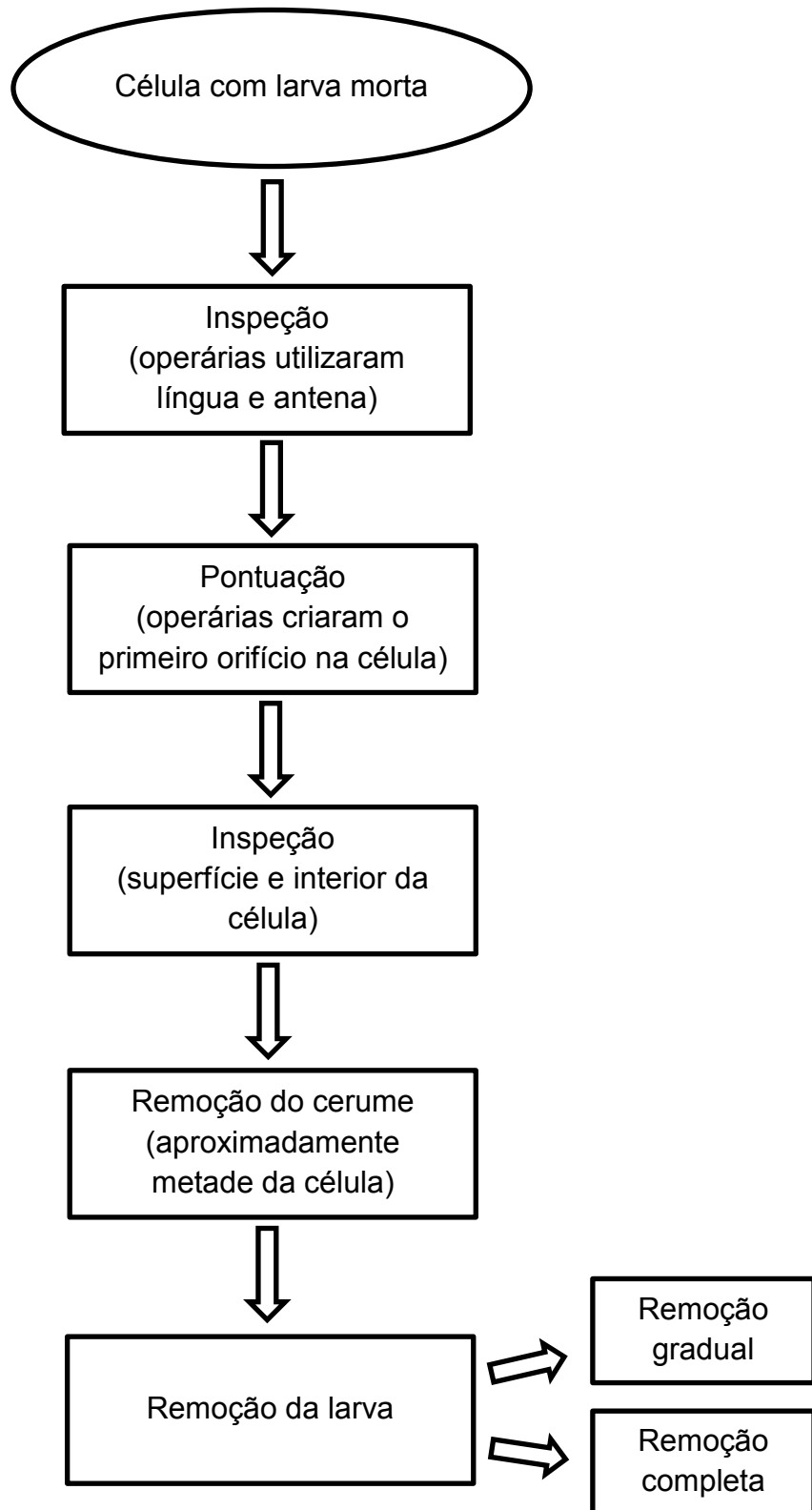
ANEXO 1

Tabela 1. Média de larvas removidas de acordo com o teste-t a 5% de probabilidade. Testes preliminares: **(CI)** cores invertidas na marcação dos grupos (controle de vermelho e morto de azul); **(AI)** arenas invertidas mantendo as cores de marcação dos grupos; **(CA)** células alternadas nas arenas (grupo morto pintado de vermelho e grupo controle pintado de azul).

Preliminar	Média (grupo morto)	Desvio padrão (grupo morto)	Média (grupo controle)	Desvio padrão (grupo controle)	t –valor	GL (n-1)	p-valor
CI	11,16	6,55	0	0	4,17	10	0,001
AI	7,66	6,77	0,33	0,81	2,63	10	0,025
CA	13,66	6,37	0,33	0,81	5,08	10	< 0,001

ANEXO 2

Figura 1. Fluxograma do comportamento higiênico em *Plebeia lucii*.



ANEXO 3

Tabela 2. Padrão de remoção de cria morta de acordo com a regressão polinomial a 5% de probabilidade com base no coeficiente de determinação R².
(L) função linear; (Q) função quadrática; (C) função cúbica.

Exp.	Equação do modelo	Função	R ²	f	GL (n-1)	p-valor
1	$\hat{y} = 5,53-6,35x+2,03x^2-0,12x^3$	C	0,95	11,3	9	0,01
2	$\hat{y} = -0,86+1,01x$	L	0,92	81,66	9	< 0,001
3	$\hat{y} = 2,46-4,04x+1,45x^2-0,09x^3$	C	0,95	7,37	9	0,03
4	$\hat{y} = -7,03+6,79x-0,43x^2$	Q	0,92	18,42	9	< 0,001
5	$\hat{y} = -5,4+6,28x-0,97x^2+0,05x^3$	C	0,96	9,73	9	0,02
6	$\hat{y} = -5,2+5,5x-0,87x^2+0,04x^3$	C	0,90	6,27	9	0,04
7	$\hat{y} = -4+2,83x$	L	0,80	47,67	9	< 0,001
8	$\hat{y} = 4,03+3,8x-0,23x^2$	Q	0,93	17,48	9	< 0,001
9	$\hat{y} = -3,13+1,69x$	L	0,89	91,82	9	< 0,001
10	$\hat{y} = -1,8+1,49x$	L	0,97	225,03	9	< 0,001
11	$\hat{y} = -0,6+1,45x$	L	0,92	123,13	9	< 0,001
12	$\hat{y} = 2,96-2,08x+0,26x^2$	Q	0,81	16,07	9	< 0,001
13	$\hat{y} = 1,46-1,41x+1,03x^2-0,07x^3$	C	0,99	15,51	9	< 0,001
14	$\hat{y} = -2,53+2,4x$	L	0,85	26,75	9	< 0,001
15	$\hat{y} = 4-5,18x+1,62x^2-0,09x^3$	C	0,99	24,75	9	< 0,001
16	$\hat{y} = -6,88+4,59x-0,24x^2$	Q	0,92	10,96	9	0,01
17	$\hat{y} = -1,2+0,41x$	L	0,76	44,04	9	< 0,001
18	$\hat{y} = -0,46+1,64x$	L	0,93	64,76	9	< 0,001
19	$\hat{y} = -1,66+0,86x$	L	0,93	122,59	9	< 0,001
20	$\hat{y} = -4,26+2,3x$	L	0,94	210,64	9	< 0,001
21	$\hat{y} = -5,91+4,9x-0,25x^2$	Q	0,95	8,95	9	0,02
22	$\hat{y} = -9+11,4x-1,76x^2+0,08x^3$	C	0,96	16,85	9	< 0,001
23	$\hat{y} = -0,4+0,9x$	L	0,74	32,64	9	< 0,001
24	$\hat{y} = -4,93+12,94x-2,05x^2+0,1x^3$	C	0,96	24,95	9	< 0,001
25	$\hat{y} = 2,38-1,66x+0,23x^2$	Q	0,82	12,13	9	0,01
26	$\hat{y} = -3,96+3,61x-0,15x^2$	Q	0,96	9,66	9	0,02
27	$\hat{y} = -0,21-0,37x+0,22x^2$	Q	0,98	18,72	9	< 0,001
28	$\hat{y} = -0,21-0,37x+0,22x^2$	Q	0,95	23,77	9	< 0,001
29	$\hat{y} = 5,5-6,73x+2,1x^2-0,13x^3$	C	0,93	6,83	9	0,03
30	$\hat{y} = -5,5+10,08x-1,55x^2+0,07x^3$	C	0,95	15,09	9	< 0,001
31	$\hat{y} = -1,23-1,35x+0,33x^2-0,01x^3$	C	0,99	6,91	9	0,03
32	$\hat{y} = -2,96+9,86x-1,46x^2+0,07x^3$	C	0,93	6,64	9	0,04
33	$\hat{y} = -1,46+0,92x$	L	0,94	193,23	9	< 0,001
34	$\hat{y} = -1,06+0,81x$	L	0,80	37,64	9	< 0,001
35	$\hat{y} = -9,73+7,56x-0,46x^2$	Q	0,91	11,28	9	0,01
36	$\hat{y} = -1,13+1,55x$	L	0,89	80,36	9	< 0,001
37	$\hat{y} = -2,43+2,58x-0,69x^2+0,05x^3$	C	0,95	12,78	9	0,01
38	$\hat{y} = -2,48+3,35x-0,17x^2$	Q	0,97	19,3	9	< 0,001
39	$\hat{y} = -2,98+2,82x-0,17x^2$	Q	0,89	12,95	9	0,01
40	$\hat{y} = -3,08+2,29x-0,09x^2$	Q	0,96	7,61	9	0,03

ANEXO 4

Tabela 3. Relação entre fatores abióticos e taxa de remoção da larva ao dia de acordo com a regressão múltipla a 5% de probabilidade com base no coeficiente de determinação R^2 .

Experimento	Equações do modelo	R^2	f	GL (n-1)	p-valor
15	$\hat{y} = -20,21 + \text{temp}$	0,40	5,95	9	0,03
25	$\hat{y} = 3,22 - 0,4\text{brilho}$	0,36	5,04	9	0,05
27	$\hat{y} = 0,95 + 6,77\text{prec}$	0,64	15,91	9	< 0,001
28	$\hat{y} = 40,33 - 2,01\text{temp}$	0,42	6,46	9	0,03
21	$\hat{y} = -0,48 + 0,47\text{brilho}$	0,38	5,53	9	0,04
37	$\hat{y} = -0,18 + 0,07\text{prec}$	0,57	12,17	9	< 0,001
5	$\hat{y} = 3,15 - 0,25\text{brilho}$	0,56	11,49	9	< 0,001
39	$\hat{y} = 52,77 - 2,21\text{temp} + 0,59\text{Inte}$	0,73	10,87	9	< 0,001
40	$\hat{y} = -16,37 + 0,73\text{temp}$	0,37	5,19	9	0,04