



Volume 1 | Número 1  
2021

ISSN: 2763-6887

#### Sobre os Autores:

Andreia S. do Nascimento é Engenheira Agrônoma/UFBA, Mestre em Ciências Agrárias/UFRB e Doutora em Entomologia/USP.

Cândida M. L. Aguiar é Bióloga/UFAL, Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia)/UFPB e Doutora em Entomologia/USP

Carlos Alfredo L. de Carvalho é Engenheiro Agrônomo/UFBA, Mestre em Ciências Agrárias/UFBA e Doutor em Ciências (Entomologia)/USP.

Iara S. J. Bravo é Bióloga/USP, Mestre em Entomologia/USP e Doutora em Psicobiologia/USP

Jossimara N. de Jesus é Zootecnista/UFRB, Mestre em Ciência Animal/UFRB e faz Doutorado em Ciências Agrárias/UFRB.

Lorena A. Nunes é Bióloga/UESB, Mestre em Ciências Agrárias/UFBA e Doutora em Entomologia/USP.

# Boletim Técnico-Científico Insecta

Publicação do Grupo de Pesquisa Insecta do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

## QUANTIFICAÇÃO E MENSURAÇÃO DE ESTRUTURAS MORFOLÓGICAS UTILIZANDO O SOFTWARE IMAGEJ

Jossimara Neiva de Jesus

Lorena Andrade Nunes

Andreia Santos do Nascimento

Cândida Maria Lima Aguiar

Iara Sordi Joachim Bravo

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

## Apresentação

O Boletim Técnico Científico Insecta tem por objetivo divulgar técnicas e informações científicas de aplicação na entomologia e áreas afins, de maneira clara e objetiva, contribuindo para suprir lacunas da literatura brasileira ou ampliando as informações disponíveis sobre temas específicos, focando o estudo dos insetos ou suas relações com outras áreas do conhecimento.

Pretende-se colaborar na divulgação de técnicas e ferramentas que ajudem na execução de ensaios técnicos e científicos, assim como, revisões e impressões sobre temas específicos da entomologia e áreas correlatas.

Neste número é abordado o tema QUANTIFICAÇÃO E MENSURAÇÃO DE ESTRUTURAS MORFOLÓGICAS UTILIZANDO O SOFTWARE IMAGEJ, considerando que é cada vez mais comum a necessidade do uso de ferramentas de medição de estruturas nos estudos com animais e plantas.

De forma especial, este primeiro número comemora os 29 anos do Grupo de Pesquisa Insecta, criado em 1992 na então Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia e atualmente no Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

*Conselho Editorial*

### Sobre o Grupo de Pesquisa Insecta:

O Grupo de Pesquisa Insecta foi criado em 1992 por professores e discentes do Curso de Agronomia da então Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Teve como base estrutural o Estágio no Laboratório de Entomologia do Departamento de Fitotecnia da UFBA, criado na década de 80 pelo Prof. Oton Meira Marques. No seu início, o GPI desenvolveu pesquisa sobre pragas agrícolas, besouros coprófagos e Hymenoptera sociais, especialmente vespas, formigas e abelhas. Essas linhas de investigação deram continuidade aos estudos do Laboratório de Entomologia, que também resultaram na criação do periódico científico Insecta em 1992, encerrado em 1996. Com a criação da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) em 2006, toda a estrutura acadêmica e administrativa da então Escola de Agronomia da UFBA passou a compor a nova Universidade. A partir desta data, o GPI passou a fazer parte do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da UFRB. Desde os tempos da UFBA e atualmente na UFRB, o GPI teve e tem participação destacada no ensino de graduação e da pós-graduação, assim como nas atividades de extensão e de pesquisa e inovação. Enquanto que na UFBA recebia discentes quase que exclusivamente da graduação em Agronomia (único curso de graduação da Escola de Agronomia até o final dos anos 90) e do Mestrado em Ciências Agrárias, na UFRB passou a atender demandas de estágios supervisionados, iniciação científica e tecnológica, Mestrado Acadêmico e Mestrado Profissional, além do Doutorado Acadêmico, inclusive de turmas especiais como o DINTER de diferentes áreas. Aos 29 anos de atividade (1992-2021), continua ativo e lança este Boletim Técnico-Científico Insecta.

## QUANTIFICAÇÃO E MENSURAÇÃO DE ESTRUTURAS MORFOLÓGICAS UTILIZANDO O SOFTWARE IMAGEJ

Jossimara Neiva de Jesus<sup>1\*</sup>, Lorena Andrade Nunes<sup>2,3</sup>, Andreia Santos do Nascimento<sup>3</sup>, Cândida Maria Lima Aguiar<sup>3,4</sup>, Iara Sordi Joachim Bravo<sup>5</sup> & Carlos Alfredo Lopes de Carvalho<sup>3,6</sup>

---

1 Discente do Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas-BA;

2 Faculdade de Tecnologia e Ciências da Bahia, UniFTC, Jequié-BA

3 Pesquisador do Grupo de Pesquisa Insecta, UFRB, Cruz das Almas-BA

4 Docente da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana-BA

5 Docente da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador-BA

6 Docente da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas-BA

\* Autor correspondente

---

A pesquisa científica na área da entomologia busca compreender os fenômenos que envolvem as relações entre insetos e o meio ambiente, a fim de solucionar ou até mesmo se antecipar aos problemas envolvendo esses organismos. A ciência e a tecnologia são mutuamente estimuladas para o desenvolvimento de equipamentos que possibilite esses estudos, desde a invenção do primeiro microscópio em 1665 (BRADBURY, 2014) e dos computadores modernos a partir de 1975. E mais recentemente o desenvolvimento e popularização de *softwares* de código aberto, tem permitido adequações dos sistemas para aplicação nas mais diversas áreas da pesquisa, contribuindo para estudos mais detalhados de estruturas de animais e plantas.

O **ImageJ** é um programa de edição, análise e processamento de imagem, projetado para imagens científicas multidimensionais. Foi inspirado e aperfeiçoado a partir do programa NIH Image que foi desenvolvido por Wayne Rasband (1987) no National Institute of Mental Health, Maryland, Estados Unidos da América (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). No entanto, apenas em 1997, quando a linguagem de programação Java estava se tornando popular, foi possível desenvolver o **ImageJ**, programa executável em qualquer sistema operacional, inclusive como aplicativo em navegadores da rede.

**ImageJ** é altamente extensível, permite contribuições de usuários com experiência em programação e amadores. Atualmente, o programa dispõe de milhares de *Plugins* e *Scripts* para realizar uma ampla variedade de tarefas. Contudo, apesar

de simples, a interface do programa não é tão intuitiva e requer algumas tentativas para utilizar corretamente suas ferramentas.

## 1. Download e interface do ImageJ

Para baixar o programa no seu computador utilize o endereço de busca (<https://imagej.nih.gov/ij/>) e clique na opção *Download* para escolher a versão compatível com o sistema operacional do seu computador (Figuras 1 e 2).

O programa é executável, ou seja, não requer instalação. Para facilitar o acesso, sugere-se copiar o arquivo executável e colar no *Desktop* (área de trabalho) do computador. A janela do programa possui uma barra de *Menu*, uma barra de ferramentas e uma barra de status, que mostrará informações da ferramenta selecionada (Figura 3).

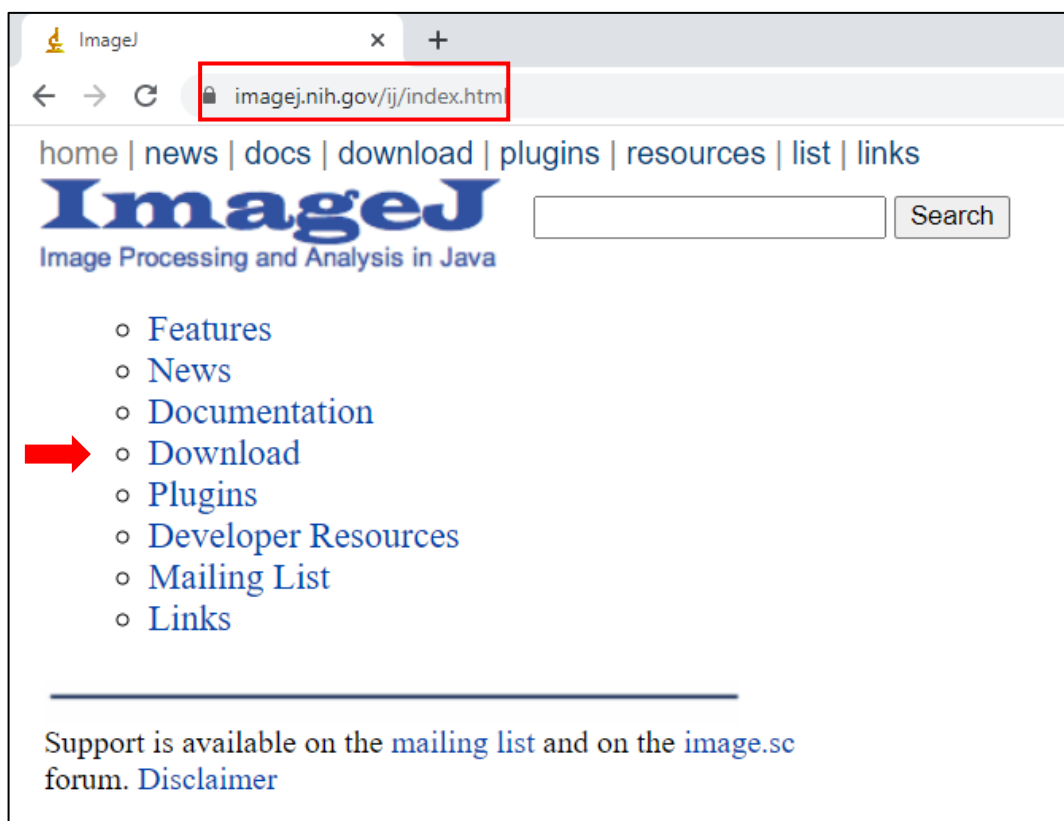


Figura 1. Instruções para *download* do programa ImageJ

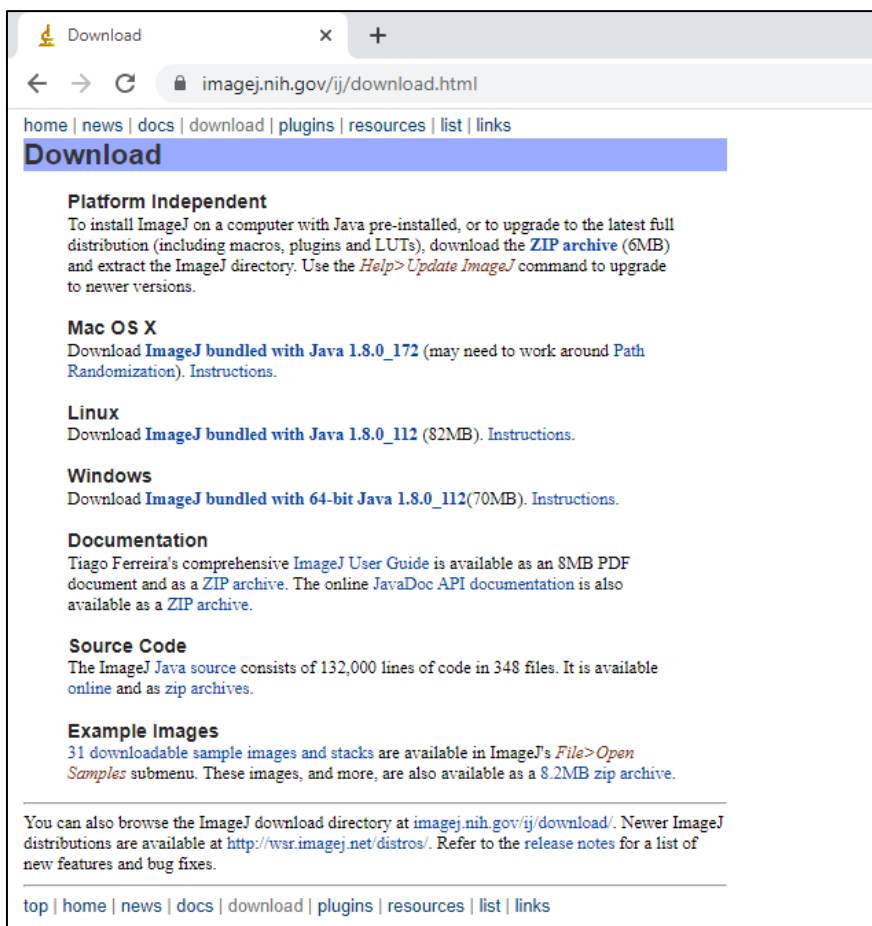


Figura 2. Instruções para download do programa ImageJ

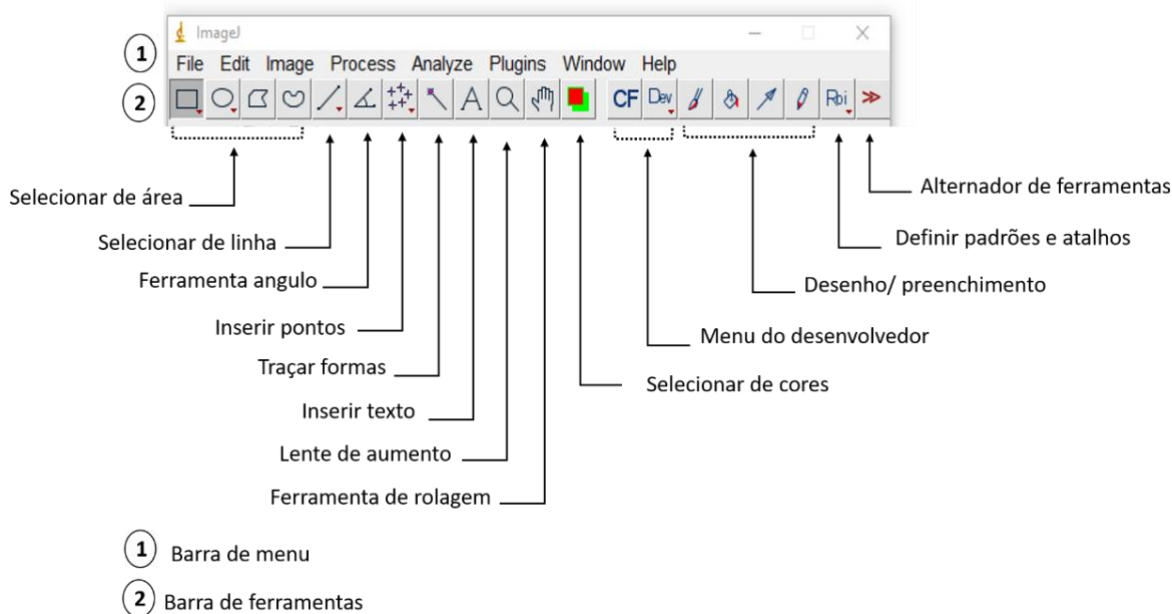


Figura 3. Interface e opções de comando

## 2. As barras de menu e ferramentas

**Barra de menu:** As opções da barra de menu permitem importar ou criar imagens, editar, analisar, além de disponibilizar diferentes *plugins* para processamento de imagens com diferentes abordagens.

**Barra de ferramentas:** Os botões da barra de ferramentas podem ser categorizados em ferramentas de seleção de área; mensuração; edição e ferramentas de comando.

Recomenda-se para usuários do **ImageJ** o uso do *mouse*, por facilitar os comandos. Além disso, em alguns botões há possibilidade de expandir opções usando um clique com o botão direito ou duplo-esquerdo do *mouse*.

- Ferramentas de seleção de área: Os primeiros quatro botões na barra de ferramentas permitem delimitar uma área na imagem em formato retangular, oval, poligonal ou à mão livre. Após a seleção, essas áreas podem ser alteradas, analisadas, copiadas ou recortadas, usando os comandos do *menu*.

- Ferramentas de seleção de linha: Este botão permite criar linhas retas, segmentadas ou à mão livre. Para alterar a largura da linha basta um duplo clique no *mouse*.

- Ferramenta Ângulo: Desenha duas linhas que se cruzam e mede o ângulo formado.

- Ferramenta Varinha: Para executar esta ferramenta, basta colocar a varinha na borda esquerda de uma área que deseja delimitar, e, através de algoritmos, a ferramenta encontra a borda direita e traça sua forma, desde que a área esteja completamente fechada, se uma lateral estiver aberta, a ferramenta não funcionará. Em seguida, a varinha rastreará ao longo da borda do objeto até retornar ao ponto inicial.

- Ferramenta de texto: Utilizando duplo clique no *mouse* sobre este botão selecionará uma fonte e tamanho do texto. Com apenas um clique sobre o botão a caixa de texto é aberta e pode ser editada e posicionada no local desejado na imagem.

- Seletor de cores: esta ferramenta define a cor do desenho ou texto do primeiro plano quando uma cor em uma imagem é 'selecionada' com o conta-gotas. As cores também podem ser selecionadas na janela Cores clicando duas vezes no botão seletor de cores. O ícone desta ferramenta (conta-gotas) mostra a cor de primeiro plano atual, enquanto o quadro ao redor mostra a cor de fundo.

Em razão da necessidade de muitos comandos, os atalhos do teclado facilitam a rotina de análises, neste sentido, o **Quadro 1** reúne os principais atalhos e suas respectivas funções no programa, indicados no Guia de uso do **ImageJ**.

**Quadro 1.** Resumo de atalhos para comandos durante análise e edição de imagens no ImageJ.

Atalho		Função
Ctrl	+ B	Fixar as formas e texto na imagem
Ctrl	+ T	Salva cada medição em janela auxiliar
Ctrl	+ ▲	Zoom (+)
Ctrl	+ ▼	Zoom (-)
Ctrl	+ A	Seleciona todas as medições
Ctrl	+ Z	Desfaz a última alteração
Ctrl	+ Shift + D	Duplica imagem
Ctrl	+ Shift + X	Recorta a área delimitada

Fonte: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/index.html>

### 3. Inserir imagens e calibrar escalas

Este programa pode exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8 bits, 16 bits e 32 bits. O programa pode ler diversos formatos de imagem como TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM e FITS. Ele é capaz de calcular áreas e estatísticas, valores em pixel com as seleções definidas pelo usuário. Pode-se, ainda, medir distâncias e ângulos, produzir histogramas de densidade e gráficos de perfis. Ele suporta ajustes como contraste, nitidez, detecção de bordas e filtros. Para trazer ao programa uma imagem dos arquivos do computador deve-se clicar na opção *file* disponível na barra de menu e em seguida na opção *open* (Figura 4), esse comando é o mesmo utilizado em outros programas computacionais.

É recomendado antes do processamento das imagens, a duplicação da imagem que será analisada para manter sempre uma foto original. Essas fotos podem ficar dispostas paralelamente na janela de trabalho, ou serem minimizadas. Os comandos para duplicação estão indicados na Figura 5.

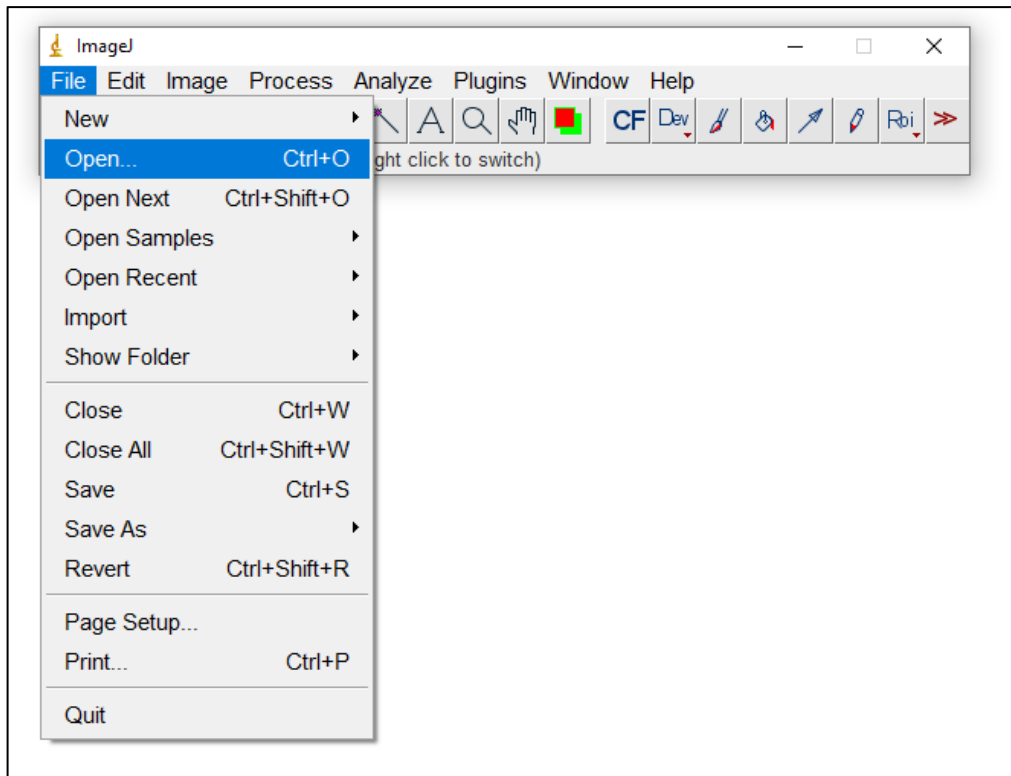


Figura 4. Comando para inserir imagem no programa ImageJ.

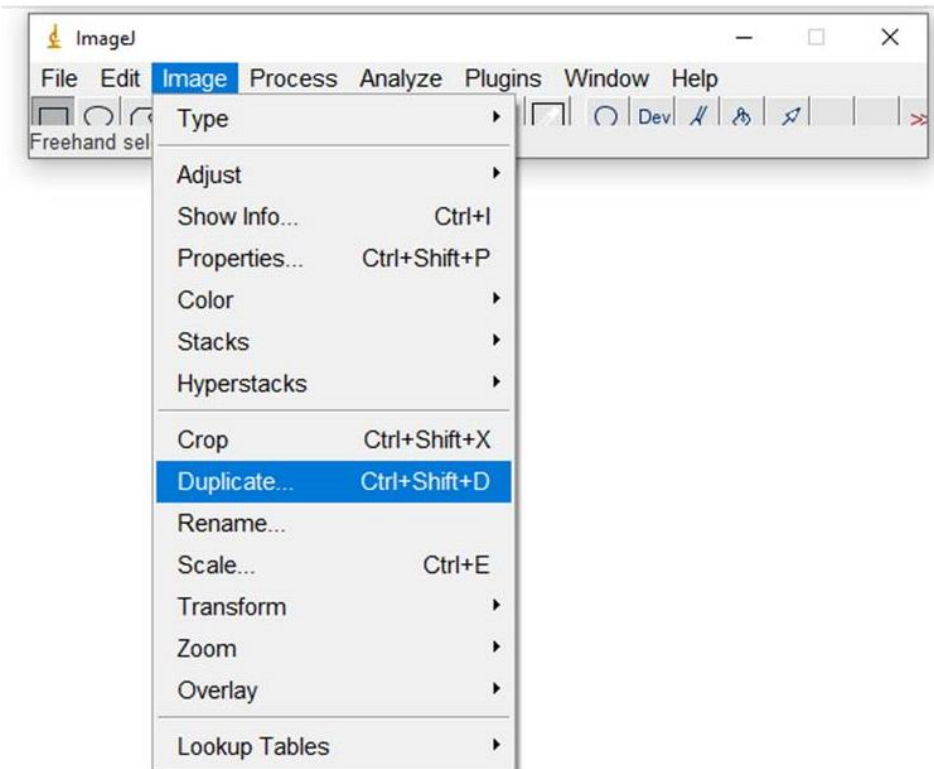
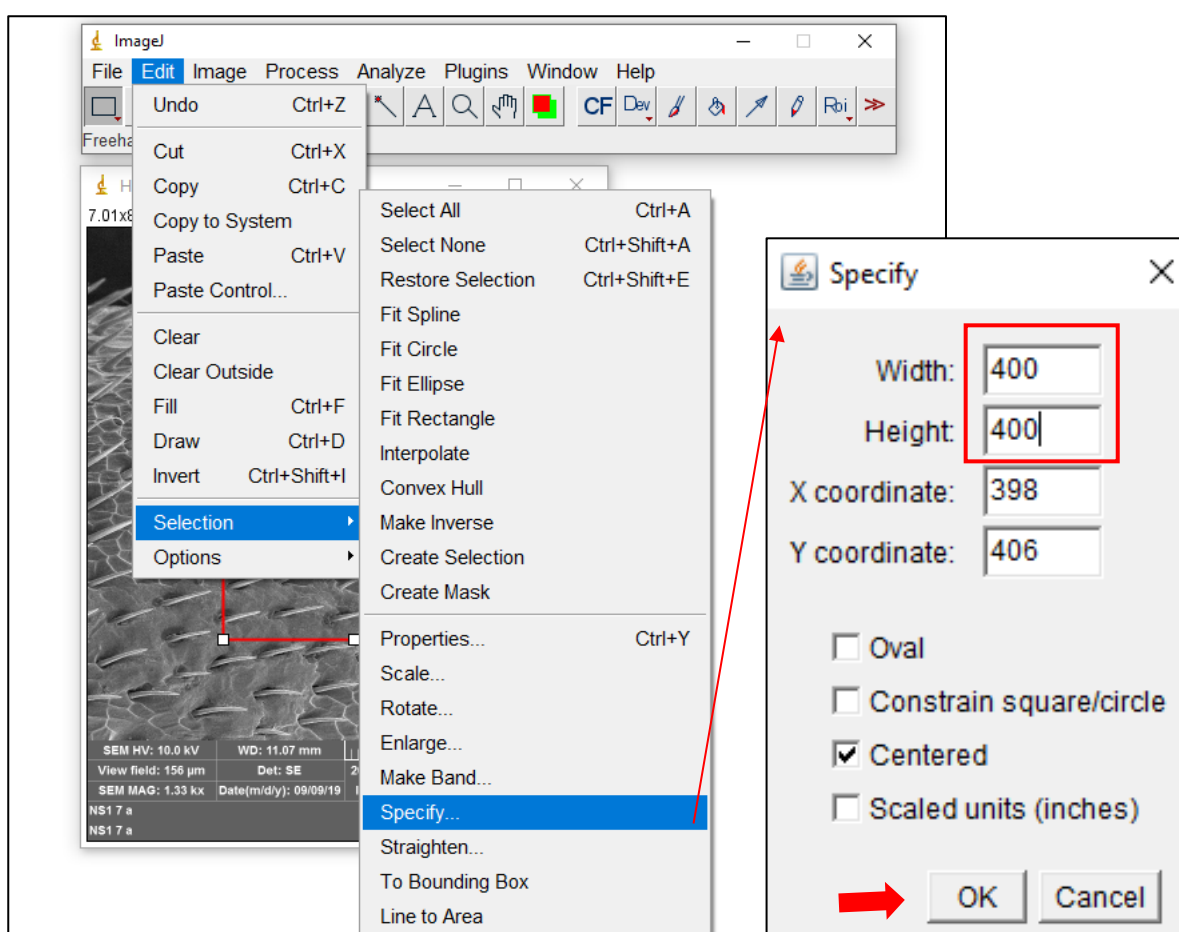


Figura 5. Comando para duplicação da imagem no programa ImageJ.



De modo geral, nos estudos de quantificação e mensuração de estruturas, busca-se quantificar e/ou mensurar uma área da imagem, para tanto, deve-se delimitar a área de interesse. Com o *Mouse*, selecione ícone de retângulo e desenhe na área de interesse. Com a forma ainda selecionada na imagem deverá selecionar o botão *Edit* na barra de *Menu*, e clicar na opção *Selection*. Uma nova janela será aberta e deverá escolher a opção *Specify* e indicar o tamanho da área a ser delimitada (Figura 6), no exemplo está indicada uma área com 400 *pixels* de largura x 400 *pixels* de altura. Esses comandos auxiliam o usuário a padronizar o tamanho da forma, isso deverá ser repetido em todas as imagens a serem medidas.

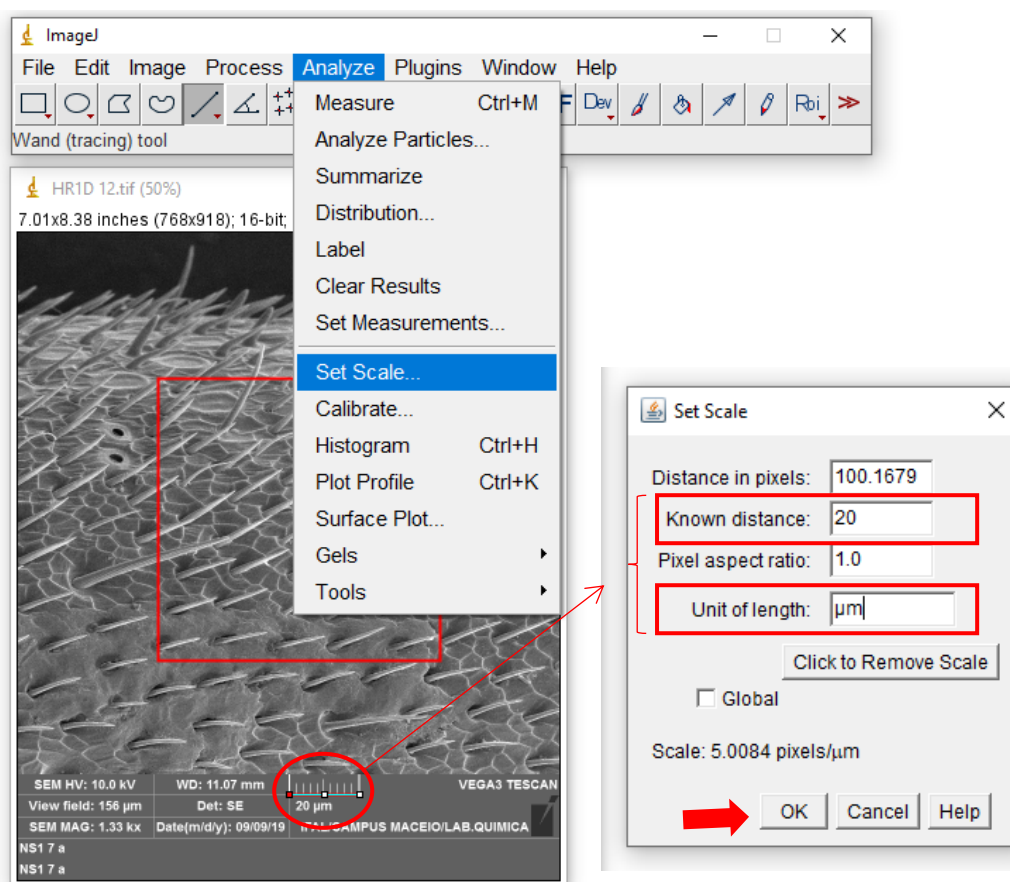


**Figura 6.** Comando para sobrepôr e dimensionar formas na imagem no ImageJ.

Para fixar a área delimitada na imagem deverá pressionar no teclado o atalho **Ctrl + B**. A partir daí poderá ampliar ou reduzir a imagem sem alterar a área de interesse.

Já para calibrar a imagem em pixels com a sua escala correspondente com a unidade conhecida, deverá ser traçada uma linha sobre a escala da imagem (Figura 7). Para definir com precisão o início e o final da linha sobre a escala pode se utilizar o **Ctrl + ▲** ou **Ctrl + ▼** para aumentar (+) ou reduzir (-) o zoom, respectivamente. É necessário posicionar o cursor do *Mouse* na área em que se pretende ampliar.

Após traçada a linha, deverá clicar no botão *Analyze* na barra de *Menu* e seleccionar a opção *Set Scale*, que abrirá uma nova janela de comando. Nessa janela indicar na opção *Known Distance* a medida indicada na escala da imagem. Na opção *Unit of Length* indicar a unidade de medida presente na escala, na sequência clicar em *Ok* para confirmar as alterações.



**Figura 7.** Calibrar distâncias em pixel com base na escala com unidade conhecida da imagem.

### 3. Medições e análise das estruturas

Após inserir a imagem, delimitar a forma e calibrar a escala poderá iniciar as análises. Para medição de distâncias indica-se o uso da ferramenta linha, a

configuração padrão dessa ferramenta pode ser alterada quanto a cor e largura. Para alterar a largura da linha traçada é necessário um duplo clique sobre ícone da linha na barra de ferramentas e definir a largura ideal. Para alterar a cor, deverá selecionar o ícone de linha na barra de ferramentas e, na barra de *Menu* clicar na opção *Edit*, que abrirá uma janela de comando na qual deverá clicar em *Options*, em seguida na opção *Colors* para escolher a cor desejada.

Para iniciar as medições utilizando a ferramenta linha, deverá posicionar o cursor do *Mouse* na extremidade basal da estrutura a ser medida, e utilizar o comando de *Zoom +* (Quadro 1) para traçar a linha, dessa forma terá maior precisão da medição.

Ainda utilizando os atalhos, deverá reduzir o zoom e continuar o traço no comprimento da estrutura e aumentar o zoom para finalizar a medição com precisão. Caso deseje fixar a linha na imagem, utilizar o atalho **Ctrl + B**. Para continuar traçando outras linhas deverá utilizar o comando **Ctrl + T** a cada medição. Esse comando adiciona cada medição em uma janela auxiliar (Figura 8), na qual é possível renomear cada medição utilizando números ou códigos alfanuméricos.

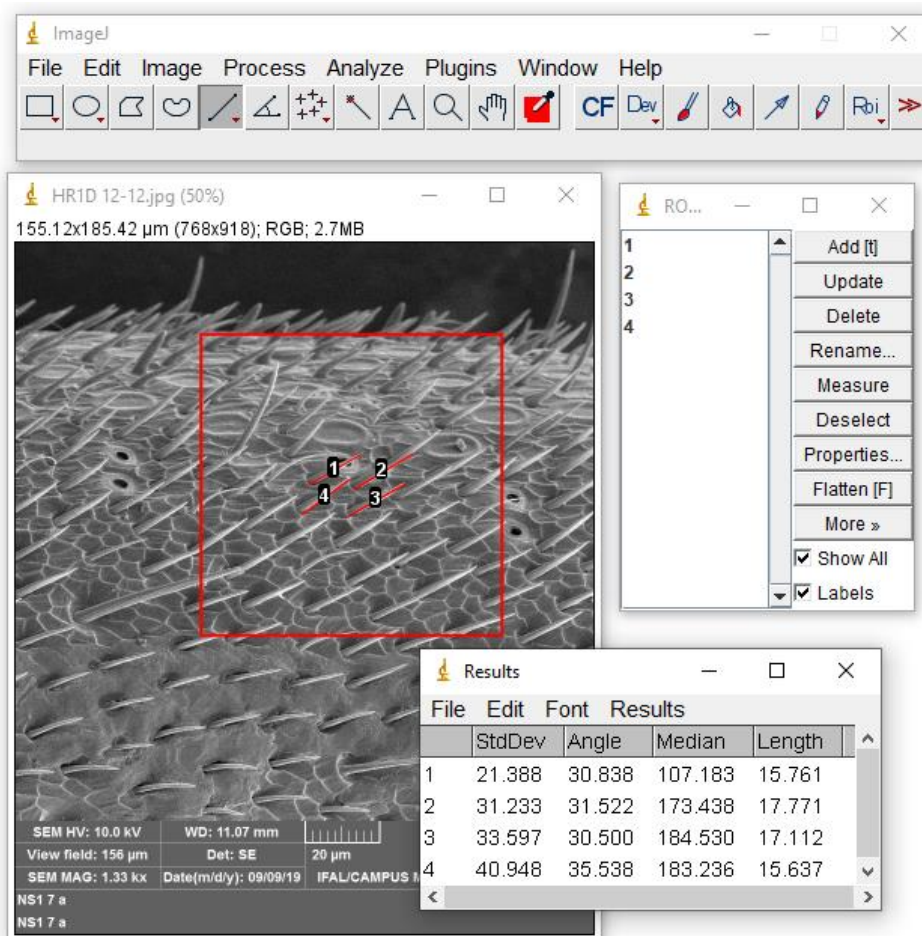


Figura 8. Medição utilizando a ferramenta linha e obtenção de dados.

Para renomear, deverá selecionar a medição a ser renomeada e selecionar a opção *Rename*. Ainda nesta janela, as opções *Show all* e *Labels*, quando selecionadas (Figura 8), indicam na imagem a estrutura correspondente a cada medida com uma sequência numérica.

O comando **Ctrl + Z** poderá ser utilizado para desfazer uma marcação realizada incorretamente. Só é possível desfazer a última marcação utilizando esse comando. No entanto, se desejar excluir uma ou mais medições incorretas deverá manter selecionada a linha que deseja excluir e clicar no botão *Delete* no teclado.

Ao finalizar as marcações, deverá clicar no botão *Measure*, para exibir uma tabela contendo a medida de comprimento (*Lenght*) de cada estrutura. Na tabela de resultados, se as medidas estiverem no formato de notação científica deverá desativar essa formatação, clicando em *Results* e na opção *Set Measurements* desabilitar a caixa de texto *Scientific notation*.

A tabela de resultados poderá ser copiada (**Ctrl + A**) e colada em qualquer outro aplicativo de edição de planilhas eletrônica. Para salvar as medições, entrar em *File* e *Save* ou *Save As*, inserindo o nome que desejar. É possível salvar a imagem com as marcações feitas para posterior conferência seguindo os comandos indicados na Figura 9.

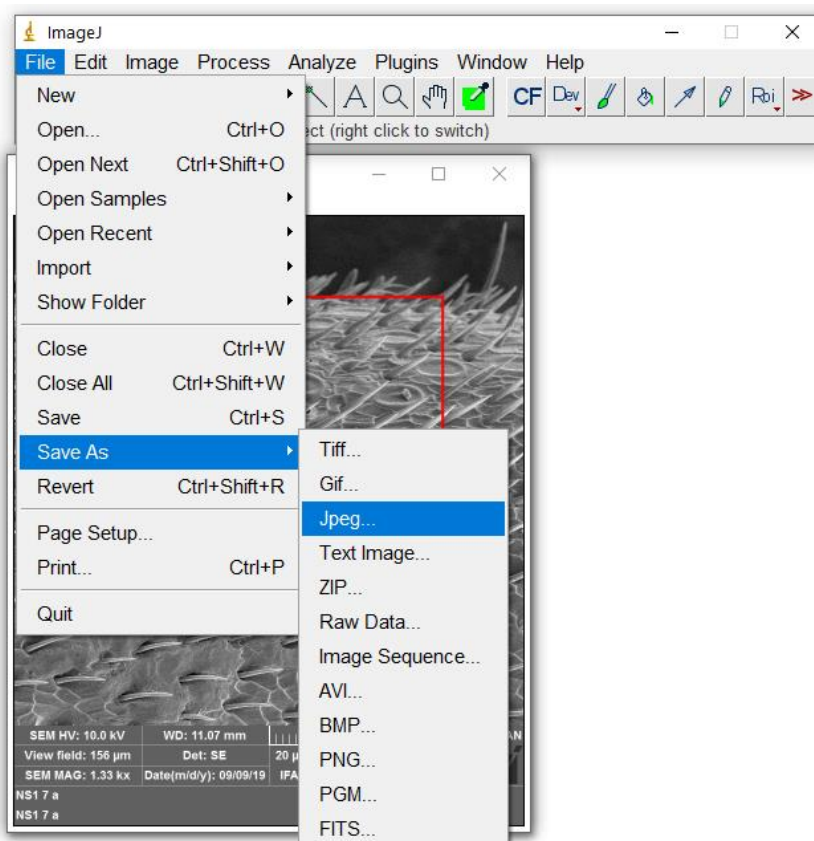


Figura 9. Salvar uma imagem editada no IMAGEJ.

#### 4. Exemplos de aplicação

Os exemplos a seguir podem ser extrapolados para a medição de outros tipos de estrutura de animais e plantas.

##### 4.1. Exemplo 1: Morfometria de asa de abelhas

A morfometria é introduzida como uma abordagem quantitativa para procurar informações que diz respeito a variações e mudanças nas formas (tamanho e formato) dos indivíduos e das populações. Também pode ser definida como uma análise quantitativa das formas biológicas (UTKUALP; ERCAN, 2015). Diferentes termos podem ser utilizados para se referir as análises morfométricas como morfometria tradicional, morfometria linear, morfometria convencional e até mesmo morfometria multivariada. Essa técnica tem um intuito de verificar alterações morfológicas nos indivíduos a partir de medidas lineares como comprimento, largura, altura e incluindo ainda os ângulos (MARCUS, 1990; ROHLF; MARCUS, 1993).

Estudos morfométricos surgiram a partir de inúmeros questionamentos dos pesquisadores com relação ao crescimento do corpo relacionado especialmente ao processo ontogenético, como ocorre o polimorfismo e o dimorfismo sexual, além das relações com as variações geográficas, diferenças entre táxons, tamanho e limites fisiológicos entre outros (REYMENT, 1985; MARCUS, 1990).

As análises morfométricas com abelhas, usualmente são realizadas a partir das asas, pois foi verificado em abelhas do gênero *Apis* que a herdabilidade deste caráter geralmente é alta, sofrendo pouca variação do ambiente (DINIZ-FILHO; BINI, 1994). Deste modo, ela indica ser um caractere com elevado componente genético para avaliar a estruturas populacionais. Além disso, é importante ressaltar a relevância biológica dessa estrutura e a sua simetria é essencial para a capacidade de voo do indivíduo e conseqüentemente o desenvolvimento de toda a colônia, por isso que elas possuem um mecanismo de regulação das abelhas que garanta certa simetria (BRÜCKNER, 1976).

Alguns estudos utilizando dados morfométricos com asas em abelhas sociais foram realizados, e encontradas diferenças significativas. Esse caractere juntamente com a técnica de análise morfométrica pode ser aproveitado em estudos populacionais como o realizado em *Melipona scutellaris* em diferentes regiões da área de distribuição na Bahia por Nunes et al., (2007) e Lima Junior et al., (2015), bem como diferenças populacionais em *Melipona quadrifasciata anthidioides* localizadas na Região Semiárida da Bahia (NUNES et al., 2008). Além disso, pode ser utilizada



para verificar alterações ambientais como o estudo realizado avaliando o desenvolvimento das abelhas *Apis mellifera ligustica* submetida a baixa temperatura e comparando o que esse fator ambiental interfere no processo de metamorfose e no desenvolvimento das veias das asas (ZHU et al., 2018). Ainda podem ser realizadas pesquisas na identificação taxonômica como o estudo realizado com a espécie *A. mellifera* para o reconhecimento de subespécies e ecótipos e ainda ser capaz de verificar a origem genética das colônias para fins de reprodução (MEIXNER et al., 2013).

A morfometria pode ser utilizada além da caracterização de raças, para verificar padrões de simetria em asas de *Apis* (UNIYAL et al., 2017). Na separação de castas e na identificação de *Tetragonula iridipennis* (SINGH; KHAN, 2019). Além do mais, também podem ser realizados estudo com abelhas solitárias como *Anthophora plumipes*, associando o padrão de simetria das asas com fatores ambientais, uma vez que o padrão de simetria pode ser influenciado por variáveis como a poluição ambiental e falta de alimentos (BANASZAK-CIBICKA et al., 2018).

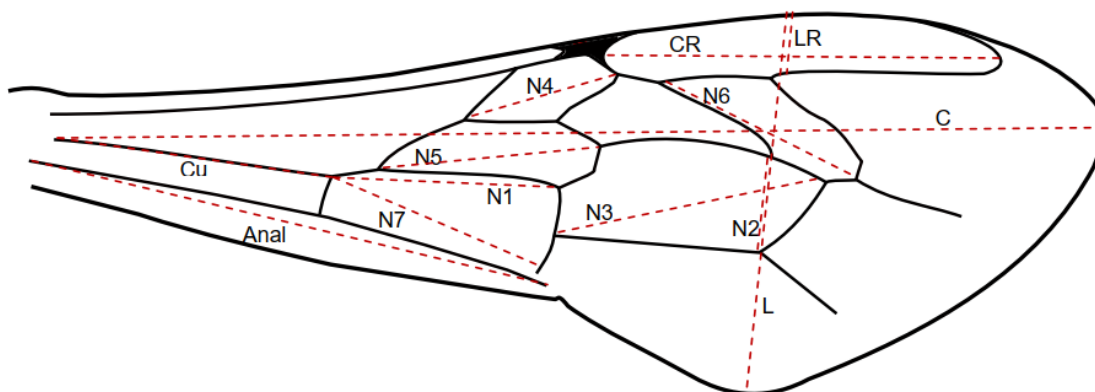
Para a análise morfométrica em asas de abelhas, após a coleta os indivíduos podem ser armazenados em álcool até a utilização. Se faz necessário a remoção das asas, vale ressaltar que pode ser utilizada a asa anterior e posterior, ou apenas uma delas a depender do objetivo do estudo, para isso pode-se utilizar uma pinça de ponta fina sem serrilha ou uma tesoura. Após remoção, as asas devem ser dispostas entre lâminas de microscopia, para fixação usa-se uma solução de cola, diluída em água destilada para evitar a proliferação de fungos, após secagem da cola com água, as lâminas são seladas com esmalte incolor (Figura 10).



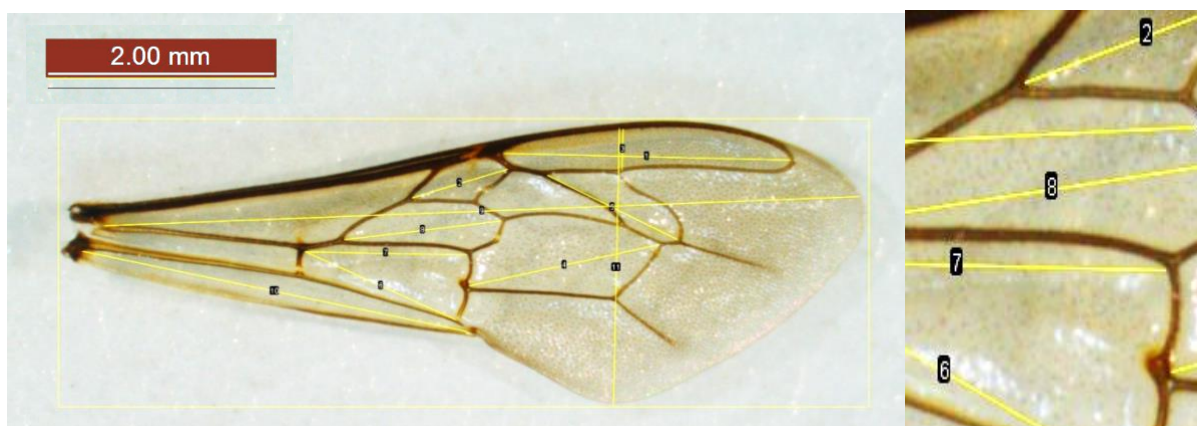
**Figura 10.** Asas anteriores dispostas entre lâminas para microscopia.

A partir desse material as imagens das asas podem ser capturadas por uma câmera acoplada a um estéreo microscópio. Com as imagens capturadas as asas estão prontas para serem mensuradas, podem ser utilizadas medidas como indicadas nas Figuras 11 e 12.

Após obtenção dos dados é utilizada a estatística multivariada de forma a verificar as alterações morfométricas, a partir de análises exploratórias.



**Figura 11.** Esquema da asa anterior de *Apis mellifera* com medidas utilizadas para a realização das análises convencionais. CR (comprimento da célula radial), LR (largura da célula radial), Cu (nervura cubital), Anal (nervura anal), L (largura total), C (comprimento total) e N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7 (nervura 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 respectivamente).



**Figura 12.** Fotografia da asa anterior com as linhas demarcando as distâncias pelo ImageJ.

## 4.2. Exemplo 2: Entomopalinologia

A palinologia é uma ciência multidisciplinar, com aplicações diversas, que estuda os grãos de pólen de plantas angiospermas e esporos de plantas pteridófitas e fungos (CORREIA; FRANCISCO; PERUQUETTI, 2017). Esta ciência é subdividida em diferentes eixos, dentre os quais está inserida a entomopalinologia que representa os estudos de grãos de pólen por meio de insetos e seus produtos (JONES; JONES, 2001; HALBRITTER et al., 2018). Um exemplo a ser citado é a melissopalinologia que estuda os grãos de pólen em produtos das abelhas (PONNUCHAMY et al., 2014; CORREIA; FRANCISCO; PERUQUETTI, 2017). Este ramo da palinologia/entomopalinologia tem se destacado devido ao crescente interesse da utilização desta ciência e suas técnicas para identificar as espécies vegetais importantes para insetos sociais como as abelhas (ANDRADE et al., 2019; SANTOS et al., 2020).

### **Melissopalinologia de produtos da colmeia de abelhas sociais**

O estudo da flora visitada por abelhas é uma das linhas de pesquisa com contribuição potencial para o conhecimento da ecologia destes insetos, principalmente para compreensão da interação inseto-planta, estudo de nicho trófico, e no caso das abelhas sociais utilizadas para atividade apícola e meliponícola. Estes estudos são necessários para preservação e manutenção das espécies vegetais de interesse no pasto apícola, visando o aumento da produção (ANDRADE et al., 2019; COH-MARTÍNEZ et al., 2019; SANTOS et al., 2020).

Comumente, a análise polínica (melissopalinologia) de produtos da colmeia de abelhas sociais, bem como de resíduos de ninhos de abelhas solitárias é empregada como técnica para identificação das plantas utilizadas como fonte de recursos tróficos por estes insetos (CALAÇA et al., 2018; SANTOS et al., 2019). Assim, a referida análise pode ser aplicada para estudo dos grãos de pólen presentes em produtos das abelhas sociais como mel, pólen, cera, própolis, geoprópolis, pão de abelhas e samburá com a finalidade de identificação do táxon, sendo o espectro polínico (conjunto de grãos de pólen presentes na amostra) útil como indicador da interação planta-polinizador.

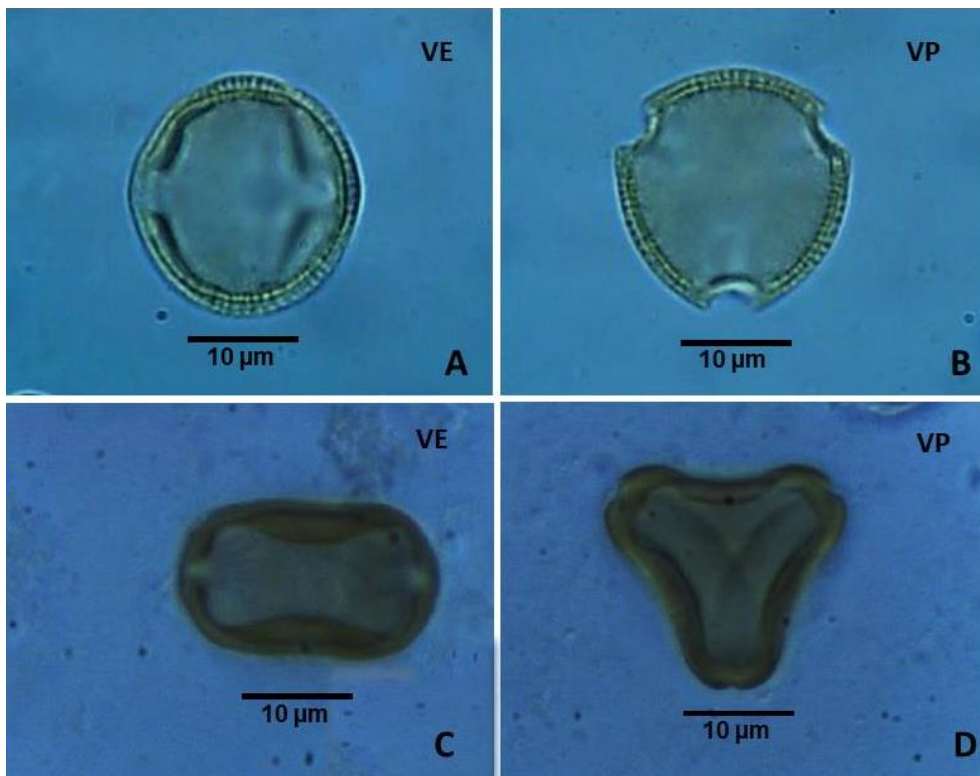
Adicionalmente, o estudo polínico também pode ser utilizado para identificar a flora visitada por Lepidoptera em investigações de interações ecológicas (AVILA JUNIOR et al., 2010), assim como para identificação de espécies vegetais associadas a insetos predadores como Neuroptera - Chrysopidae e Coleoptera - Coccinellidae usando o pólen como marcador natural e para tanto, utiliza-se o corpo do inseto como



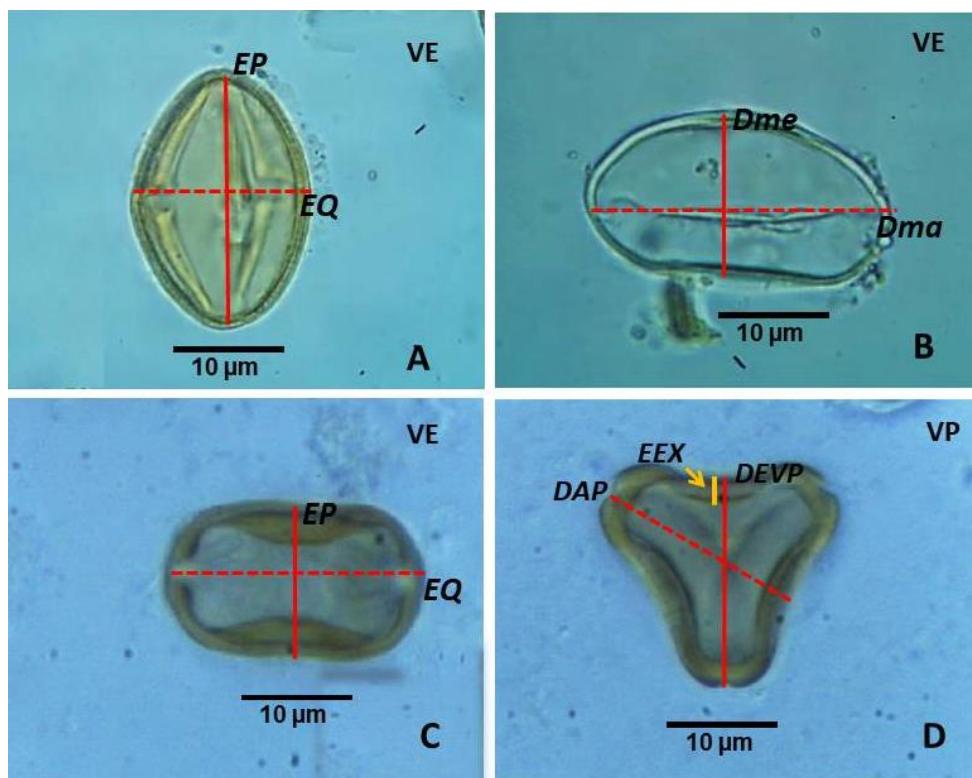
matriz amostral, pois o conteúdo polínico pode estar presente no trato digestivo ou aderido a estruturas do corpo do inseto (MEDEIRO et al., 2010).

O emprego da melissopalínologia requer dedicação e muito estudo, pois a identificação dos tipos polínicos presentes no espectro de pólen de determinado produto das abelhas é uma tarefa complexa e que deve ser executada de forma criteriosa (VON DER OHE et al., 2004; SANTOS, 2011). A determinação da afinidade botânica do grão de pólen segue etapas baseada em seus caracteres morfológicos como exemplo: âmbito, tipos poros, tipo de abertura de poros, ornamentação de exina, espessura da exina, tamanho do grão de pólen (medições em vista polar e equatorial) entre outros (Figuras 13 e 14). Nesse sentido, o software **ImageJ** pode ser considerado uma ferramenta com potencial para utilização nos estudos de análise polínica do mel, pólen, própolis e outros produtos das abelhas sociais. Na interface deste software é possível fazer a mensuração dos grãos de pólen no que diz respeito a medidas do eixo equatorial, eixo polar, espessura da exina, diâmetro maior e diâmetro menor, dentre outros parâmetros morfológicos (Figura 15).

As medidas dos grãos de pólen presente no conteúdo polínico de produtos das abelhas permitem a classificação deste quanto à forma e tamanho que varia de pequeno à gigante conforme descrito no **Quadro 2**. Além da utilização para identificar a flora visitada por insetos como as abelhas a análise da morfologia polínica também é empregada na botânica sistemática, o que denota o amplo espectro de estudos morfométricos para os quais o software **ImageJ** pode ser utilizado.



**Figura 13.** Fotomicrografias de grãos de pólen em vista equatorial - VE (A e C) e vista polar - VP (B e D). A-B = Rubiaceae e C-D = Myrtaceae (*Eucalyptus* sp.).



**Figura 14.** Exemplo esquemático para medição de grãos de pólen em vista equatorial- VE = (A-C) e vista polar- VP = (D): EP = eixo polar, EQ = eixo equatorial, EEX = espessura da exina, Dma = diâmetro maior, Dme= diâmetro menor, DAP = diâmetro da área polar e DEVP = diâmetro equatorial em vista polar. A= Anacardiaceae (*Spondias* sp.), B= Arecaceae (*Cocos nucifera*) e C-D= Myrtaceae (*Eucalyptus* sp.).

**Quadro 2.** Parâmetros morfológicos para classificação dos grãos de pólen.

Classe de Forma	Relação P/E	Classe de tamanho	
Peroblata	$\leq 0,50$	Muito pequeno	$< 10 \mu\text{m}$
Oblata	0,51 - 0,75	Pequeno	10-24 $\mu\text{m}$
Suboblata	0,76 - 0,88	Médio	25-49 $\mu\text{m}$
Oblata esferoidal	0,89 - 0,99	Grande	50-99 $\mu\text{m}$
Esférica	1,00	Muito grande	100-200 $\mu\text{m}$
Prolata esferoidal	1,01 - 1,14	Gigante	$\geq 200 \mu\text{m}$
Subprolata	1,15 - 1,33	---	---
Prolata	1,34 - 1,99	---	---
Perprolata	$\geq 2,00$	---	---

Fonte: Erdtman (1952). P= medida do eixo polar e E= medida do eixo equatorial.

### Preparo do material polinífero

Em estudos com a finalidade de identificação da flora visitada pelas abelhas, nicho trófico, amplitude e largura de nicho tróficos baseados no espectro polínicos dos produtos da colmeia, comumente o método de acetólise descrito por Erdtman (1960) é utilizado no processamento das amostras, e posteriormente o sedimento polínico resultante será montado entre lâmina e lamínula para análise microscópica. Para utilizar o **ImageJ** é necessário a captura da imagem dos grãos de pólen que compõem o espectro polínicos da amostra ou da espécie vegetal que constitui a palinoteca (coleção de grãos de pólen de referência). Para esta finalidade é necessário que o microscópio utilizado seja equipado com câmera que permita a captura de imagens com qualidade de cada grão de pólen, permitindo que o pesquisador possa formar o banco de dados com as imagens dos grãos que serão medidos. As imagens devem ser capturas em até sete dias após o preparo da lâmina com material polinífero, a fim de evitar a deformação dos grãos, o que compromete a confiabilidade das medições (MELHEM et al., 2003).

As imagens dos grãos de pólen devem ser capturas em vista equatorial (VE) e vista polar (VP) para o mesmo táxon quando possível, exceto para grão de morfologia apolar. A Figura 15 exemplifica imagens de tipos polínicos capturadas em VE e VP. De acordo com as metodologias descritas por Erdtman (1952), Barth e Barbosa (1979) e Melhem et al. (2003) para cada táxon devem ser capturadas 25 imagens de grãos de pólen em VP (n= 25) e VE (n= 25) as quais serão utilizadas para as mensurações. A medição da exina pode ser realizada com 10 imagens. A captura das imagens pode ser realizada a partir da visualização dos grãos em microscópio

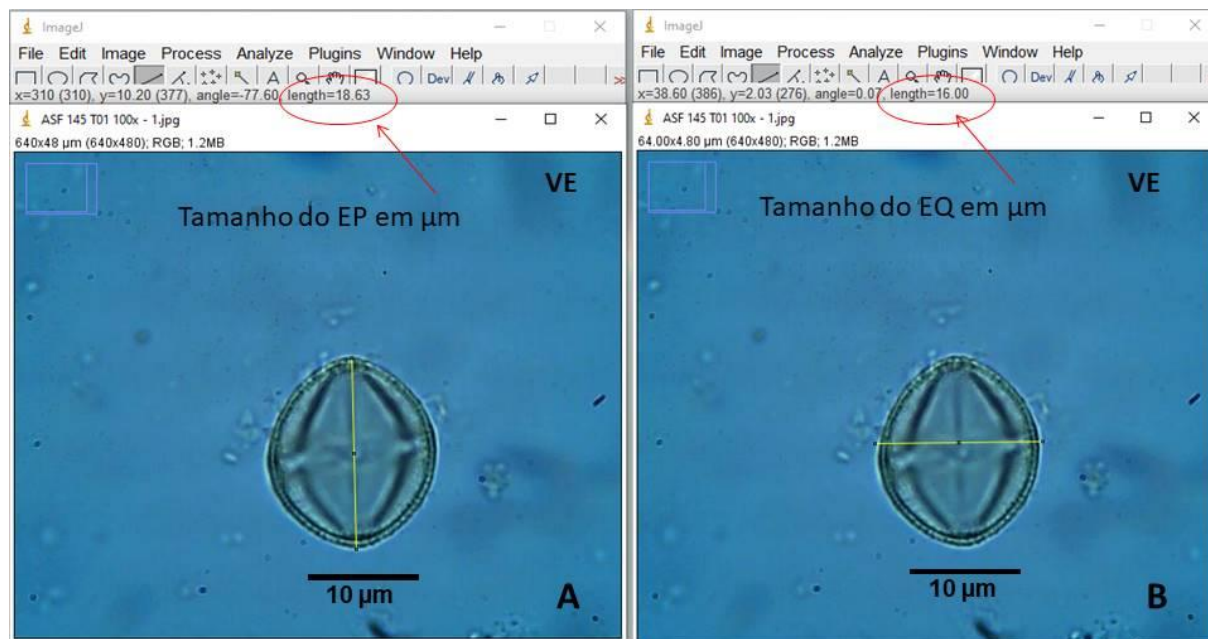
óptico ou por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), a depender do recurso disponível para o pesquisador.

### Medição do grão de pólen no ImageJ.

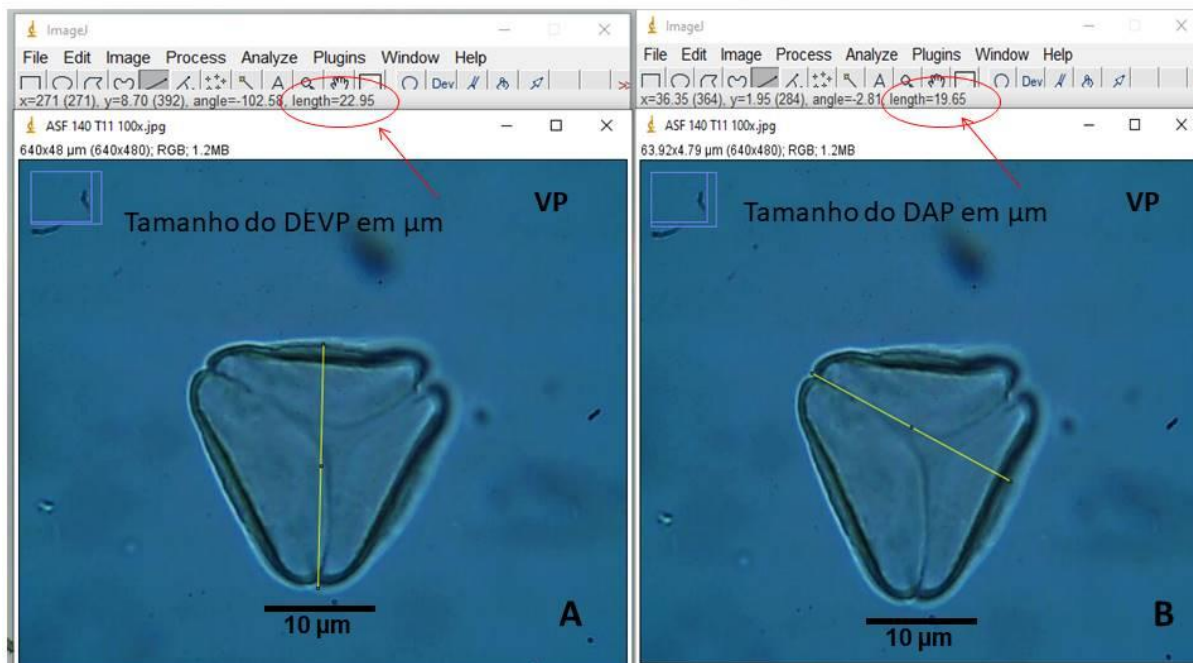
Com o banco de dados das imagens polínicas (fotomicrografias) formado é possível utiliza-las no software ImageJ. Todos os procedimentos referentes ao uso do software descritos anteriormente devem ser seguidos como a delimitação da área da imagem (Barra de menu clicando em *Edit – Selection – Specify*; Figura 6) e calibração da imagem definindo a unidade de medida das fotomicrografias (Barra de menu clicando em *Analyze – Set Scale – Unity of Length*, Figura 7).

Para o exemplo mostrado a seguir, as amostras de mel (produto da colmeia de abelhas sociais) foram preparadas pelo método de acetólise (Erdtman, 1960), imagens capturas em um microscópio óptico Olympus (CX41) com uma câmera digital Olympus (Evolet E-330) acoplada, com lente objetiva de 100x, utilizando óleo de imersão, com dimensões de 640x480 pixels e salvas em formato JPEG (Figuras 15 e 16). As imagens foram mensuradas em micrometros ( $\mu\text{m}$ ).

A morfologia polínica auxilia na identificação dos tipos polínicos e o software **ImageJ** pode ser empregado neste tipo de estudo, sendo esta considerada uma ferramenta promissora para entomopalinologia.



**Figura 15.** Medição de tipo polínico ( $\mu\text{m}$ ) em vista equatorial (VE) no software ImageJ. Grão de pólen de Anacardiaceae. A- medição do Eixo polar (EP) e B- medição do Eixo equatorial (EQ).



**Figura 16.** Medição de tipo polínico em vista polar (VP) no software ImageJ. Grão de pólen de Myrtaceae. A- DEVP= diâmetro equatorial em vista polar e B- usemos DAP= Diâmetro da área polar.

### 4.3. Exemplo 3: Morfometria de sensilas antenais de abelhas

Os insetos interagem com indivíduos coespecíficos e demais organismos do meio através de eficientes mecanismos de comunicação desenvolvidos ao longo da evolução. Os estímulos utilizados na comunicação dos insetos são de natureza física como sinais visuais, táteis e vibracionais, e possivelmente o mais importante, os sinais de natureza química. Os estímulos químicos são compostos voláteis que medeiam a comunicação entre os organismos, sendo então chamados de semioquímicos (LAW; REGNIER, 1971).

A recepção dos semioquímicos nos insetos ocorre principalmente nas antenas, estas, possuem estruturas chamadas sensilas que funcionam como receptores sensoriais (olfato, gustação, mecanorrecepção, termorrecepção e higrorrecepção) (HANSSON; STENSMYR, 2011) e também função tátil. No interior destas sensilas, encontram-se neurônios receptores, responsáveis por processar as informações em função do tipo de sinal recebido e desencadear um comportamento de resposta nos insetos (CHEN, 2003).

As sensilas são classificadas de acordo com sua morfologia ou função, sendo encontrados na família Apidae até 13 tipos, classificados segundo Frasnelli et al. (2010) e Ravaiano et al. (2014) como: [sensilas tricoides (I, II, III, IV, V, VI), sensila

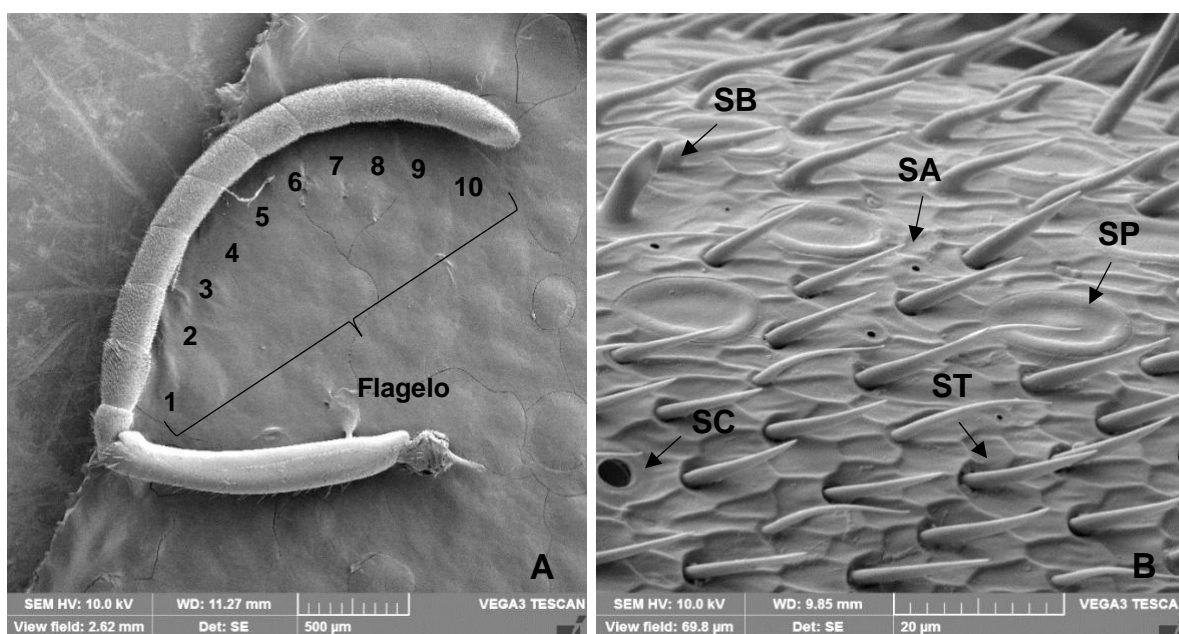


cética, placoide, celocônica, campaniforme, ampulácea, basicônica e setae]. O padrão de tipo e distribuição das sensilas varia entre as espécies, castas, idade e hábito alimentar dos insetos (CHEN, 2003).

Diversos estudos têm sido realizados em abelhas (FRASNELLI et al., 2010; RAVAIANO et al., 2014; CARVALHO et al., 2017), afim de investigar o padrão das sensilas nas diferentes espécies e fornecer informações que auxiliem na compreensão do comportamento social, coleta de alimento, defesa, além dos efeitos de alterações no ambiente sobre esses insetos.

Neste sentido, o software **ImageJ** pode ser considerado uma importante ferramenta para a investigação das sensilas das abelhas e demais insetos, uma vez que oferece diversas possibilidades de análises. Assim, nesta aplicação será apresentado um roteiro para quantificar e mensurar sensilas presentes nas antenas de abelhas.

As fotografias utilizadas nas análises foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura unidade Tescan Mark, modelo VEGA3 LMU. A Figura 17 mostra a antena direita de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, espécie de abelha sem ferrão e alguns dos tipos de sensilas encontrados nessa espécie.

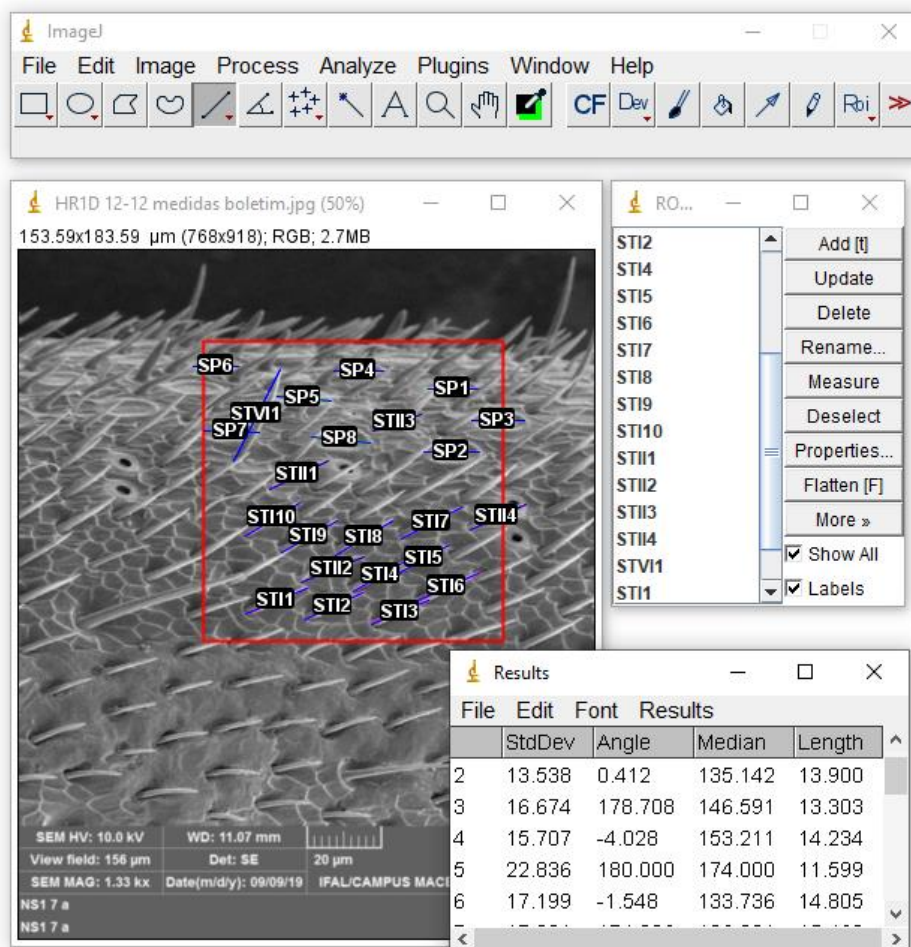


**Figura 17.** A - Antena direita em face ventral de *Melipona quadrifasciata anthidioides* destacando os flagelomeros onde estão localizadas as sensilas. B- Tipos de sensilas em *M. q. anthidioides*: Basicônica (SB); Placoide (SP); Ampulácea (SA); Tricoide (ST); Celocônica (SC).

### Medição de sensilas no ImageJ.

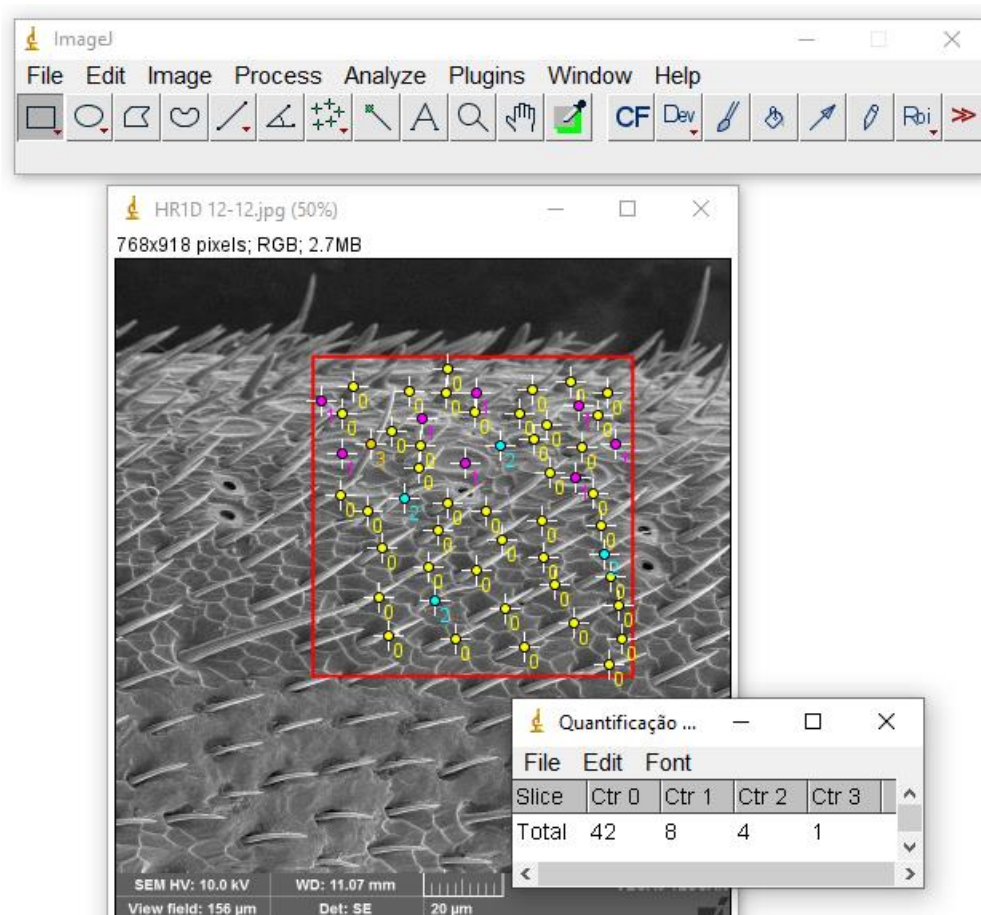
Para análise das imagens no **ImageJ** foram seguidos todos os procedimentos já descritos inicialmente neste boletim, assim, nesta seção estão exibidas a análise da imagem no software e resultados obtidos.

Para a mensuração foram escolhidas aleatoriamente 10 sensilas de cada tipo, no entanto para os tipos com número de sensilas inferior a 10, estas foram mensuradas em sua totalidade (Figura18).



**Figura 18.** Medição do comprimento de sensilas olfativas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Os códigos alfanuméricos representam o tipo de sensila e a quantidade mensurada: S. Placoide (SP); Tricoide (ST) e seus os subtipos I, II e VI.

Para a quantificação de cada tipo de sensila foi utilizada a ferramenta *Multi-point* disponível na barra de ferramentas do **ImageJ**. As sensilas do mesmo tipo receberam cores iguais, para iniciar a contagem de outro tipo de sensila foi necessário um duplo clique sobre o ícone da ferramenta para mudar a opção *Counter*, onde cada grupo de sensilas deve receber uma numeração diferente. Finalizadas as marcações na imagem, o comando **Alt + Y** exibe a contagem de pontos categorizada (Figura19).



**Figura 19.** Quantificação de sensilas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Os tipos de sensilas são representados por cores diferentes na imagem e código de controle na tabela: S. Placodea (Magenta; Ctr 1); Tricoide I (Amarelo; Ctr 0); Tricoide II (Ciano; Ctr 2); Tricoide VI (Laranja; Ctr 3).

Na tabela 1 estão apresentadas as médias e desvio padrão do comprimento e quantidade de cada tipo de sensila encontrado em uma amostra da antena de *M. q. anthidioides*.

**Tabela 1.** Quantificação e mensuração de sensilas olfativas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* no Software IMAGEJ.

Tipo de sensila	Quantidade de sensilas na área	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )
S. Placodea	8	13,938 $\pm$ 1,237
S. Tricoide I	42	17,355 $\pm$ 0,889
S. Tricoide II	4	16 $\pm$ 2,000
S. Tricoide IV	1	16.492*

Os dados são média e desvio padrão de cada tipo de sensila mensurada. \*O valor apresentado corresponde a mensuração unitária, uma vez que só foi encontrado uma Sensila Tricoide IV na área delimitada.



Foram encontrados 2 tipos de sensilas olfativas, as sensilas placodea e tricoides, estas apresentaram 3 subtipos, de acordo com a classificação de Ravaiano et al. (2014). As sensilas mais abundantes foram as Sensilas Tricoides do tipo I com 42 sensilas.

### Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado a JNJ e ao CNPq pela Bolsa PQ concedida à CALC. Ao Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas do Instituto Federal de Alagoas (IFAL), Campus de Maceio-AL, pelas microfotografias obtidas em microscopia eletrônica de varredura.

### Referências Bibliográficas

- ANDRADE, B. R.; NASCIMENTO, A. S.; FRANCO, E. L.; SANTOS, D. R.; ALVES, R. M. O.; COSTA, M. A. P. C.; CARVALHO, C. A. L. Pollen spectrum and trophic niche width of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) in highly urbanized and industrialized sites. **Sociobiology**, v.66, n.2, p.279-286, 2019.
- AVILA JUNIOR, R. S.; CRUZ-BARROS, M. A. V.; CORREA, A. M. S.; SAZIMA, M. Tipos polínicos encontrados em esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) em área de Floresta Atlântica do sudeste do Brasil: uso da palinologia no estudo de interações ecológicas. **Brazilian Journal of Botany**, v.33, n.3, p.415-424, 2010.
- BANASZAK-CIBICKA, W.; FLISZKIEWICZ, M.; LANGOWSKA, A.; ŻMIHORSKI, M. Body size and wing asymmetry in bees along an urbanization gradient. **Apidologie**, v.49, n. 3, p.297-306, 2018.
- BARTH, O. M.; BARBOSA, A. F. Catálogo sistemático dos polens das plantas arbóreas do Brasil Meridional XV - Myrtaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.70, n.4, p.467-478, 1972.
- BRADBURY, S. **The evolution of the microscope**. Oxford: Pergamon Press, 1967, 357 p.
- BRÜCKNER, D. The Influence of Genetic Variability on Wing Symmetry in Honeybees (*Apis mellifera*). **Evolution**, v. 30, n. 1, p. 100-108, 1976.
- CALAÇA, P.; SIMEÃO, C.; BASTOS, E. M.; ROSA, C. A.; ANTONINI, Y. On the trophic niche of bees in cerrado areas of Brazil and yeasts in their stored pollen. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. W. (Ed.) **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology**. New York: Springer, 2018. p.241-252.
- CARVALHO, W. J.; FUJIMURA, P. T.; BONETTI, A. M.; GOULART, L. R.; CLOONAN, K.; SILVA, N. M.; LEAL, W. S. Characterization of antennal sensilla, larvae morphology and olfactory genes of *Melipona scutellaris* stingless bee. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0174857, 2017.
- CHEN, H. H.; ZHAO, Y. X.; KANG, L. Antennal sensilla of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) in relation to food preferences and habits. **Journal of Biosciences**, v. 28, p. 743-752, 2003.
- COH-MARTÍNEZ, M. E.; MARTÍNEZ-PUC, J. F.; BASU, S. K.; NOGUERA-SAVELLI, E.; CUEVAS, M. J. Perceptions of the local beekeepers on the diversity and flowering phenology of the melliferous flora in the community of Xmabén, Hopelchén, Campeche, Mexico. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.15, n.16, p.2-16, 2019.
- CORREIA, F. S.; FRANCISCO, R. S.; PERUQUETTI, R.C. Palinologia e a interação planta-abelha: revisão de literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.20, n.4, p.247-251, 2017.
- DINIZ-FILHO, J.A.F.; BINI, L.M. Space-free correlation between morphometric and climatic data: a multivariate analysis of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) in Brazil. **Global Ecology and Biogeography Letters**, v.4, n. 6, p.195-202, 1994.

- ERDTMAN, G. **Pollen Morphology and plant Taxonomy**. Angiosperms, Chronica Botanica Co., Mass. 1952, 532p.
- ERDTMAN, G. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**, v.39, p.561-564, 1960.
- FRASNELLI, E.; ANFORA, G.; TRONA, F.; TESSAROLO, F.; VALLORTIGARA, G. Morpho-functional asymmetry of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 2, p. 221-225, 2010.
- HALBRITTER H. SILVIA ULRICH, S.; GRÍMSSON, F.; WEBER, M.; ZETTER, R.; HESSE, M.; BUCHNER, R.; SVOJTKA, M.; FROSCHE-RADIVO, A. Palynology: history and systematic aspects. In: **Illustrated Pollen Terminology**. Springer: Cham, 2018. p. 3-21.
- HANSSON, B. S.; STENSMYR, M. C. Evolution of insect olfaction. **Neuron**, v. 72, n. 5, p. 698–711, 2011.
- JONES, G. D.; JONES S. D. The uses of pollen its implication for entomology. **Neotropical Entomology**, v.30, p.341-350, 2001.
- LAW, J. H.; REGNIER, F. E. Pheromones. **Annual review of biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 533-548, 1971.
- LIMA JUNIOR, C. A.; CARVALHO, C. A. L.; NUNES, L. A.; SANTOS, W. S. Variação morfométrica entre populações disjuntas de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Interciencia**, v. 40, p. 324-329, 2015.
- MARCUS, L. F. Traditional morphometrics, In: F. J. ROHLF & F. C. BOOKSTEIN (ed.). **Proceedings of the Michigan morphometrics workshop**. The University of Michigan, Museum of Zoology, 1990, n. 2, p. 77-120.
- MEDEIROS, M. A.; RIBEIRO, P. A.; MORAIS, H. C.; CASTELO BRANCO, M.; SUJII, E. R.; SALGADO-LABORIAU, M. L. Identification of plant families associated with the predators *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) and *Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville (Coleoptera: Coccinellidae) using pollen grain as a natural marker. **Brazilian Journal of Biology**, v.70, n.2, p.293-300, 2010.
- MEIXNER M. D.; PINTO, M. A.; BOUGA, M.; KRYGER, P.; IVANOVA, E.; FUCHS, S. Standard methods for characterizing subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. COLOSS BEEBOOK, **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 4, p. 1-27, 2013.
- MELHEM, T. S.; CRUZ-BARROS, M. A. V.; CORRÊA, A. M. S.; MAKINO-WATANABE, H.; SILVESTRE-CAPELATO, M. S. F.; ESTEVES, V. L. G. Variabilidade polínica em plantas de Campos do Jordão (São Paulo, Brasil). **Boletim do Instituto de Botânica**, n.16, p.1-104, 2003.
- NUNES, L. A.; ARAUJO, E. D.; CARVALHO, C. A. L.; WALDSCHMIDT, A. M. Population Divergence of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) Endemic to the Semi-arid Region of the State of Bahia, Brasil. **Sociobiology**, v. 52, p. 2008-93, 2008.
- NUNES, L. A.; COSTA-PINTO, M. F. F.; CARNEIRO, P. L. S.; PEREIRA, D. G.; WALDSCHMIDT, A. M. Divergência Genética em *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae) com Base em Caracteres Morfológicos. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 1-9, 2007.
- PONNUCHAMY, R.; BONHOMME, V.; PRASAD, S.; DAS, L.; PATEL, P.; GAUCHEREL, C.; PRAGASAM, A.; ANUPAMA K. Honey pollen: using melissopalynology to understand foraging preferences of bees in tropical South India. **PLoS ONE**, v.9, n.7, e101618, 2014.
- RAVAIANO, S. V.; FERREIRA, R. D.; CAMPOS, L. A.; MARTINS, G. F. The antennal sensilla of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a study of different sexes and castes. **Naturwissenschaften**, v. 101, n. 8, p. 603-611, 2014.
- REYMENT, R. A. Multivariate morphometrics and analysis of shape. **Mathematical Geology**, v.17, n.6, p.591-609, 1985.
- ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A revolution in morphometrics. **Trends in Ecology and Evolution**, v.8, p.129-132, 1993.
- SANTOS, A. M. V.; NASCIMENTO, A. S.; SILVA, J. S.; LUCAS, C. I. S.; SILVA, S. M. P. C.; CARVALHO, C. A. L. Pollen spectrum of the honey of *Apis mellifera* L. collected in the period of honey production. **Scientific Electronic Archives**, v.12, n.6, p.69-76, 2019.

SANTOS, F. A. R. Botanical analysis of bee pollen loads. **Magistra**, Cruz das Almas, v.23, n. especial, p.5-9, 2011.

SCHINDELIN, J.; RUEDEN, C. T.; HINER, M. C.; ELICEIRI, K. W. The ImageJ ecosystem: an open platform for biomedical image analysis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 82, n. 7-8, p. 518-529, 2015.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SINGH, P.; KHAN, M. S. Morphometric characterization of the stingless bees, *Tetragonula iridipennis* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.7, n.5, p.852-859, 2019.

UTKUALP, N.; ERCAN, I. Anthropometric measurements usage in Medical Sciences. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 404261, 2015.

VON DER OHE, W.; ODDO, L. P.; PIANA, M. L.; MORLOT, M.; MARTIN, P. Harmonized methods of melissopalynology. **Apidologie**, v.35, n.1, p.S18-S25, 2004.

ZHU, X.; XU, X.; ZHOU, S.; WANG, Q.; CHEN, L.; HAO, Z.; ZHOU, B. Low temperature exposure (20°C) during the sealed brood stage induces abnormal venation of honey bee wings. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 3, p. 458-465, 2018.



**Boletim Técnico-Científico  
Insecta, v.1, n. 1, 2021**

Esta publicação está disponível no endereço:  
<https://www.ufrb.edu.br/boletiminsecta>

1ª Edição  
Versão eletrônica (2021)

Grupo de Pesquisa *Insecta*, CCAAB, UFRB, Rua  
Rui Barbosa, 710 - Centro - Cruz das Almas/BA -  
44.380-000

**Conselho Editorial:**

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho  
Edilson Divino Araújo  
Geni da Silva Sodré  
Gilberto Marcos de Mendonça Santos  
Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa  
Reginaldo Barros  
Yzila Liziane Farias Maia de Araújo  
Zuleide Silva de Carvalho