

ANÁLISE LONGITUDINAL NA DETERMINAÇÃO DO FOTOPERÍODO ADEQUADO PARA CRIAÇÃO DE ABELHAS EM LABORATÓRIO

Carla Regina Guimarães BRIGHENTI¹
Marcelo Angelo CIRILLO²
Deodoro Magno BRIGHENTI³

- RESUMO: A adequada exposição à luminosidade torna-se necessária para que haja um aumento da longevidade de insetos nos experimentos laboratoriais. Nos bioensaios com *Apis mellifera*, cada unidade amostral é constituída de um grupo de abelhas confinadas na mesma gaiola, assim a mortalidade de certo número de abelhas poderá influenciar a mortalidade das demais. No que diz respeito a este fato, tem-se uma carência na literatura de técnicas estatísticas que forneçam uma condição experimental ideal para a criação de abelhas adultas acondicionadas em grupo. O presente trabalho objetivou realizar uma análise longitudinal, com a finalidade de verificar o efeito da dependência temporal na mortalidade das abelhas, sendo essas submetidas a diferentes fotoperíodos. Para isso, utilizou-se a técnica de equações de estimação generalizadas aplicada ao modelo logit, na qual, foi avaliada a viabilidade de incorporar estruturas de correlação que relacionem a mortalidade das abelhas, observadas dentro de cada gaiola, ao longo do tempo. Concluiu-se que não existe dependência temporal entre as observações dentro de uma gaiola, em se tratando desta espécie de abelhas estudada. Para todos os fotoperíodos avaliados, o fotoperíodo caracterizado pela ausência de luz apresentou menor proporção de mortalidade durante todos os tempos avaliados, sendo este o mais recomendado.
- PALAVRAS-CHAVE: GEE; dependência; logit; longevidade; abelhas.

1 Introdução

A manutenção e a criação de abelhas adultas em laboratório ainda apresentam dificuldades aos pesquisadores, já que se trata de um inseto social. Faz-se necessário, otimizar as condições laboratoriais para que a correta manutenção seja feita, permitindo maior longevidade aos indivíduos para que experimentos realizados com estes em confinamento, venham corresponder de maneira objetiva aos efeitos esperados em campo (OECD, 1998).

Dentre os inúmeros fatores que devem ser estudados, destaca-se o fotoperíodo que, em síntese, refere-se ao tempo de incidência de luz sobre os insetos, levando estes a mudanças comportamentais e caracterizando os diferentes padrões relativos às suas

¹ Universidade Federal de São João Del Rei – Campus Alto Paraopeba, CEP: 36300-088, São João Del Rei, MG, Brasil. E-mail: carlabrighenti@ufsj.edu.br

² Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Caixa .Postal. 37, CEP 37200-000 Lavras, MG, Brasil. E-mail: macufla@gmail.com

³ Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Caixa .Postal. 37, CEP 37200-000 Lavras, MG, Brasil. E-mail: deodoro_santos@yahoo.com.br

atividades (BECK, 1980). No caso de abelhas confinadas, o fotoperíodo poderá ser controlado através da programação de iluminação das câmaras climatizadas.

Alguns dos fotoperíodos mais utilizados em experimentos entomológicos são 12L:12E (12 horas de luz e 12 horas de escuro por dia), considerado um dia de comprimento “normal” (ROBINSON e PARTRIDGE, 2001; KRÜGER et al., 2003; SILVA, 2004; BLOCH et al., 2006; BRIGHENTI et al., 2007) e o fotoperíodo chamado de dia longo (16L:8E) (Saunders et al., 2004, GALVAN et al., 2005; GUNDERSEN-RINDAL e PEDRONI, 2006).

Outros experimentos foram realizados tendo como objetivo principal a determinação do fotoperíodo adequado. Nesse contexto, citam-se SUWA & GOTOH (2006) que determinaram o fotoperíodo crítico para desenvolvimento de ovos do *Tetranychus puevaricola* utilizando cinco diferentes fotoperíodos (10L: 14E, 11L: 13E, 11,5L: 12,5E, 12L: 12E e 13L: 11E); ARGOLLO et al. (2002) que estudaram a influência do fotoperíodo na reprodução e longevidade de *Orius insidiosus*; FUCHIKAWA & SHIMIZU (2007) que avaliaram a influência de três fotoperíodos (0L:24E, 12L:12E, 24L:0E) em *Apis cerana japonica*.

Alguns experimentos foram realizados alternando-se os diferentes ciclos do fotoperíodo como, por exemplo, HUANG et al. (2005) que utilizaram os ciclos de luz (16L:8E) e (12L:12E) durante o período larval de *Dendrolimus punctatus* e o escuro total (0L:24E) como condição para maior ocorrência de diapausa; BLOCH & MESHI (2007) que conduziram trabalhos de verificação comportamental em abelhas colocadas em gaiolas individuais utilizando regime de iluminação misto, sendo que, nos primeiros seis dias foi usado o fotoperíodo (12L:12E), e, nos últimos seis dias, utilizaram o escuro constante (0L:24E).

No que tange as orientações para testes químicos de toxicidade com abelhas européias (OECD, 1998 e EPA, 1996), a orientação é que as abelhas sejam mantidas no escuro (0L:24E). Esta orientação foi seguida por HOOVER et al. (2006) que avaliaram o efeito da variação sazonal sobre o ovário de operárias de *A. mellifera*, mantendo-as por dez dias no escuro total (0L:24E) antes da dissecação, indicando ser este o ciclo com menor índice de atividade.

Um fato a ser considerado é que, em média, a *A. mellifera*, sob as condições climáticas do Brasil passa os 20 primeiros dias de sua vida (quase 50% do total) no interior de uma colméia, a qual possui baixa ou mesmo nenhuma luminosidade. Esse fato reforça a necessidade de procurar um valor adequado para programação do ‘timer’ do fotoperíodo para o caso específico da criação de abelhas. Isto porque, um inseto exposto a menor quantidade de luz tem menor atividade e, conseqüentemente, um possível aumento de sua longevidade (SOUTHWICK, 1992).

Além disso, no caso da *A. mellifera*, que é um inseto social, normalmente, cada unidade experimental de um bioensaio é constituído de um grupo de abelhas confinadas em gaiolas. No entanto, é razoável supor que a mortalidade de certo número de abelhas pertencentes a uma mesma gaiola, poderá influenciar a mortalidade das demais, devido à fatores tais como a liberação de toxina em experimentos de toxicidade, ou ao abaixamento de temperatura devido à diminuição do número de indivíduos por gaiola. Assim sendo, sugere-se a realização de uma análise estatística, cuja modelagem possa considerar que as observações coletadas em uma mesma unidade experimental (gaiolas) ao longo do tempo tendam a ser correlacionadas (PÉREZ & FREIRE, 2003). Dessa forma, inúmeras estruturas de correlação temporal poderão ser avaliadas para agregar informações a uma

análise mais acurada, no sentido de que inferências referentes aos parâmetros do modelo sejam feitas assumindo uma estrutura de correlação apropriada para determinação do melhor fotoperíodo.

Devido à falta de informação sobre o efeito da mortalidade por gaiola no fotoperíodo adequado da espécie *A. mellifera*, proveniente de regiões tropicais como o Brasil, objetivou-se determinar, em condições de laboratório, o fotoperíodo que propicie maior longevidade dessa espécie. Com esse propósito, foram avaliados cinco fotoperíodos por meio da modelagem de equações de estimação generalizadas, conhecidas como GEE (DIGGLE et al., 2002) com a finalidade de estudar o efeito da dependência temporal em relação à proporção média da mortalidade de abelhas verificadas em cada gaiola.

2 Metodologia

Em consonância com o objetivo proposto, a metodologia utilizada nesse trabalho foi realizada nas seguintes etapas: planejamento e execução do experimento; seleção do modelo logit e equações de estimação generalizadas (GEE). Assim sendo, seguem abaixo as descrições.

2.1 Planejamento e execução do experimento

As abelhas *A. mellifera* foram obtidas de uma colméia selecionada no apiário central da UFPA. Cada grupo de 10 abelhas foi colocado em uma gaiola cilíndrica de PVC de 15 cm de altura por 10 cm de diâmetro, com a parte superior revestida com um filó e a inferior com organza e mantidas em uma câmara climatizada a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, e $70 \pm 10\%$ UR. Com essas condições experimentais, cada unidade experimental possuía um recipiente com pasta Cândi e um chumaço de algodão embebido em água destilada que foram oferecidos *ad libitum*.

Objetivando estudar a evolução do número de abelhas mortas em cada gaiola ao longo do tempo, foi desenvolvido um bioensaio no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia (DEN) da Universidade Federal de Lavras (UFPA), com a finalidade de comparar 5 fotoperíodos: 0L:24E; 12L:12E; 10L:14E; 8L:16E e 24L:0E, em um delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições, representadas pelas gaiolas. Dessa forma, as medidas repetidas foram caracterizadas pelo número de abelhas mortas observado dentro de cada gaiola nos tempos 12, 36, 60, 84 e 108 horas após a montagem do experimento.

Pelo fato do número de ocorrências de abelhas mortas ser observado em um intervalo de tempo e o número total de abelhas por gaiola ser também conhecido, pode-se estimar a proporção de mortalidade a cada tempo, para todos os fotoperíodos avaliados, com isso a distribuição assumida para a realização da modelagem considerando este conjunto de dados foi a binomial. Deve-se ressaltar ainda que o número total de abelhas por gaiola a cada tempo observado é conhecido, mas não fixo, sendo este número atualizado a cada novo tempo avaliado.

2.2 Seleção do modelo logit

Dada a representação do número de abelhas mortas por Y_{ijh} como a resposta observada na i -ésima gaiola, $i = 1, \dots, k$ ($k=4$), no j -ésimo tempo observado, $j = 1, \dots, n_i$

($n_i = n = 5$), do h -ésimo fotoperíodo, $h = 1, 2, \dots, p$ ($p=5$). Com essas especificações, foram ajustados modelos logit, cuja abordagem faz parte da teoria de modelos lineares generalizados (McCULLAGH & NELDER, 1989) com diferentes preditores (Tabela 1), dos quais, o valor esperado foi dado por $E(Y_{ijh}) = \mu_{ijh}$ e obtido por meio do preditor linear η_{ijh} , resultante da transformação logit (1)

$$\log\left(\frac{\mu_{ijh}}{1-\mu_{ijh}}\right) = \eta_{ijh}. \quad (1)$$

Dessa forma, o modelo logit foi dado por

$$E(Y_{ijh}) = \frac{\exp(\eta_{ijh})}{1 + \exp(\eta_{ijh})}, \text{ em que} \quad (2)$$

Nessa etapa, diferentes modelos foram originados de acordo com o preditor linear assumido (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação dos preditores avaliados para composição do modelo marginal

Preditor	η_{ijh}
P ₁	$\eta_{ijh} = \beta_0 + \beta_h + \gamma T_j$
P ₂	$\eta_{ijh} = \beta_0 + \beta_h + \gamma T_j + \delta T_j^2$
P ₃	$\eta_{ijh} = \beta_0 + \beta_h + \gamma T_j + \gamma_h T_j$
P ₄	$\eta_{ijh} = \beta_0 + \beta_h + \gamma T_j + \delta_h T_j^2$

β_h indica o efeito do h -ésimo fotoperíodo ($h = 1, \dots, 5$); T_j é o j -ésimo tempo em dias.

A seleção do melhor modelo foi feita com base na deviance (3)

$$D = 2 \sum_{h=1}^5 \sum_{j=1}^5 \sum_{i=1}^4 \left\{ y_{ijh} \log\left(\frac{\tilde{p}_{ijh}}{\hat{p}_{ijh}}\right) + (n_{ijh} - y_{ijh}) \log\left(\frac{1 - \tilde{p}_{ijh}}{1 - \hat{p}_{ijh}}\right) \right\}, \quad (3)$$

sendo n_{ijh} o número total de abelhas na gaiola i , tempo j e fotoperíodo h , $\tilde{p}_{ijh} = \frac{y_{ijh}}{n_{ijh}}$ a

estimativa de máxima verossimilhança da proporção de abelhas mortas, \hat{p}_{ijh} a correspondente probabilidade ajustada pelo modelo logit dado em (2).

Tendo em vista que a deviance (3) é assintoticamente distribuída por uma qui-quadrado (McCULLAGH & NELDER, 1989) foi possível estimar um valor- p . Um resultado não significativo (valor- $p > 0,05$) indicaria que há evidências estatísticas de que o efeito da superdispersão estaria ausente na amostra, o que resultaria em um modelo satisfatório.

Uma outra medida utilizada para selecionar o modelo foi o critério de Akaike (4). A utilização deste foi motivada por estabelecer uma medida de qualidade considerando a penalização do modelo em questão pela sua quantidade de parâmetros. Desta forma,

comparando-se diversos modelos “candidatos”, aquele que resultasse no menor valor de AIC seria selecionado.

$$AIC = -2L(\hat{\beta}) + 2d \text{ em que,} \quad (4)$$

$L(\hat{\beta})$ é o logaritmo da função de verossimilhança, sendo $\hat{\beta}$ o vetor de estimativas de máxima verossimilhança dos parâmetros do modelo candidato e d é o número de covariáveis no modelo.

Importante ressaltar que a seleção do modelo logit realizada por meio das estatísticas mencionadas em (3) e (4) foram realizadas assumindo a estrutura de correlação independente. Entretanto, na situação dos dados serem correlacionados, tais estatísticas seriam inadequadas para esse propósito. Mediante este problema e com a finalidade de investigar uma possível estrutura que explique a existência ou não dessa correlação procedeu-se com a execução da técnica GEE, descrita com maiores detalhes na seção seguinte.

2.3 Equações de estimação generalizadas (GEE)

Neste estudo longitudinal a correlação entre as observações foi caracterizada pela avaliação de medidas repetidas ao longo do tempo em relação à mesma unidade experimental identificadas pelas gaiolas em cada um dos fotoperíodos. Tendo em vista o propósito de avaliar as variações globais, observadas nas proporções de abelhas mortas verificadas em cada instante de tempo, inferiu-se o comportamento da resposta média por meio de um modelo marginal, no qual, em síntese, refere-se ao modelo linear generalizado (2) incorporando uma estrutura de correlação que seja plausível de explicar essa variação. Isto posto, as observações longitudinais de cada unidade experimental Y_{ijh} foram organizadas em um vetor $\mathbf{Y}_r = [Y_{r1}, Y_{r2}, \dots, Y_{rm}]^t$, $r=1, \dots, N=k \times p$ para cada fotoperíodo h , com média definida por

$$\boldsymbol{\mu}_r(\beta) = [\mu_{r1}(\beta), \mu_{r2}(\beta), \dots, \mu_{rm}(\beta)]^t, \quad (5)$$

matriz de covariância definida por:

$$\mathbf{V}_r = \begin{bmatrix} \text{var}[Y_{r1}] & \text{cov}[Y_{r1}, Y_{r2}] & \cdots & \text{cov}[Y_{r1}, Y_{rm}] \\ \text{cov}[Y_{r1}, Y_{r2}] & \text{var}[Y_{r2}] & \cdots & \text{cov}[Y_{r2}, Y_{rm}] \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \text{cov}[Y_{rm}, Y_{r1}] & \text{cov}[Y_{rm}, Y_{r2}] & \cdots & \text{var}[Y_{rm}] \end{bmatrix}. \quad (6)$$

Considerando o vetor de quase-escores as equações generalizadas foram estimadas por

$$\mathbf{U} = \sum_{r=1}^N \Delta_r^T \mathbf{V}_r^{-1} [\mathbf{Y}_r - \boldsymbol{\mu}_r(\beta)] = 0 \text{ em que,} \quad (7)$$

Δ_r é a matriz gradiente $n \times d$ onde cada elemento encontra-se definido em (8)

$$\Delta_r = \frac{\partial \mu_r(\beta)}{\partial \beta^t}. \quad (8)$$

Pelo fato de V_r ($r = 1, \dots, N$) ser uma matriz de covariância com estrutura de correlação desconhecida, estimou-se as correlações por meio de uma matriz de correlação, supondo-se uma estrutura conhecida pré-especificada. Tal matriz, como sugere a literatura é denominada matriz de correlação de trabalho $R_r(\alpha)$. Partiu-se do pressuposto que essa matriz seria apropriada para explicar a dependência entre as medidas repetidas ao longo do tempo dentro de cada gaiola. Desta forma, reescreveu-se a matriz V_r por (9)

$$V_r = \phi A_r^{1/2} R_r(\alpha) A_r^{1/2}, \text{ em que,} \quad (9)$$

ϕ representou o parâmetro de dispersão ou escala estimado por

$$\hat{\phi} = \sum_{r=1}^N \sum_{j=1}^n \frac{\hat{\epsilon}_{rj}^2}{(Nn - d)}, \text{ sendo que, } d \text{ é o número de covariáveis no modelo,} \quad (10)$$

$$\hat{\epsilon}_{rj} = \frac{y_{rj} - \hat{\mu}_{rj}}{\sqrt{v(\hat{\mu}_{rj})}} \text{ e}$$

$$A_r = \begin{bmatrix} v(\hat{\mu}_{r1}) & 0 & \dots & 0 \\ 0 & v(\hat{\mu}_{r2}) & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & v(\hat{\mu}_{rn}) \end{bmatrix}_{n \times n} \text{ onde} \quad (11)$$

cada elemento dessa matriz corresponde a variância de Y_{rj} como função da média marginal μ_{rj} , mostrando que de fato, esta média é uma função dos parâmetros $\beta(s)$.

A matriz correlação de trabalho $R_r(\alpha)$ que define a estrutura de dependência entre as medidas repetidas, pode ser representada pelas estruturas a seguir (HAND E CROWDER, 1996).

Independente: considera as respostas independentes numa mesma gaiola, logo a matriz de correlação $R_r(\alpha)$, é dada por

$$R_r(\alpha) = \begin{pmatrix} 1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 1 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & 1 \end{pmatrix}_{n \times n}. \quad (12)$$

Permutável: $\text{corr}(Y_{rj}, Y_{rj'}) = \alpha$, significa que a correlação entre os tempos $j = 1, \dots, n$, sendo $j < j'$, dentro de cada gaiola $r = 1, \dots, N$ é constante. Tal estrutura é conhecida também como correlação uniforme

$$\mathbf{R}_r(\alpha) = \begin{pmatrix} 1 & \hat{\alpha} & \cdots & \hat{\alpha} \\ \hat{\alpha} & 1 & \cdots & \hat{\alpha} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \hat{\alpha} & \hat{\alpha} & \cdots & 1 \end{pmatrix}_{n \times n}; \hat{\alpha} = \frac{\hat{\phi} \sum_{r=1}^N \sum_{j>j'} \hat{e}_{rj} \hat{e}_{rj'}}{\left\{ \sum_{r=1}^N \frac{1}{2} n_r (n_r - 1) - d \right\}}. \quad (13)$$

Auto-regressiva de ordem 1: $\text{corr}(Y_{rj}, Y_{rj'}) = \alpha^{|j-j'|}$, o valor desta correlação poderá ser estimado por meio da relação $E(\hat{e}_{rj}, \hat{e}_{rj'}) \approx \alpha^{|j-j'|}$ (Liang e Zeger, 1986), assim, esses autores recomendam que a estimativa $\hat{\alpha}$ será dada por meio do coeficiente angular do modelo de regressão, ajustado para a variável dependente $\log(\hat{e}_{rj}, \hat{e}_{rj'})$ em relação a $\log(|j-j'|)$. Com isso, podemos enunciar a estrutura de correlação auto-regressiva de ordem 1 por

$$\mathbf{R}_r(\alpha) = \begin{pmatrix} 1 & \hat{\alpha} & \cdots & \cdots & \hat{\alpha}^{n-1} \\ \hat{\alpha} & 1 & \cdots & \cdots & \hat{\alpha}^{n-2} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ \hat{\alpha}^{n-1} & \hat{\alpha}^{n-2} & \cdots & \cdots & 1 \end{pmatrix}_{n \times n} \quad (14)$$

em que $j=0,1,2,\dots,n-1$.

M-dependente: $\text{corr}(Y_{rj}, Y_{r,j+1}) = \alpha_j$. Tal matriz especifica a dependência das M observações anteriores. Por exemplo, se $M = n-1$, a matriz de correlação de trabalho é definida por:

$$\mathbf{R}_r(\alpha) = \begin{pmatrix} 1 & \hat{\alpha}_1 & \cdots & \hat{\alpha}_{n-1} \\ \hat{\alpha}_1 & 1 & \cdots & \hat{\alpha}_{n-2} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \hat{\alpha}_{n-1} & \hat{\alpha}_{n-2} & \cdots & 1 \end{pmatrix}_{n \times n}; \hat{\alpha}_j = \frac{\hat{\phi} \sum_{r=1}^N \hat{e}_{rj} \hat{e}_{r(j+1)}}{N-d} \quad (15)$$

Dado que a matriz de correlação de trabalho não poderá ser de fato a verdadeira matriz que representa a relação das medidas repetidas dentro de cada gaiola e sim apenas uma aproximação, Venezuela (2003) comenta que as estimativas dos parâmetros poderão não ser consistentes. Isto posto, torna-se conveniente realizar uma estimação robusta dos parâmetros, seguindo as expressões abaixo.

$$\mathbf{V}(\hat{\beta}) = \mathbf{M}_0^{-1} \mathbf{M}_1 \mathbf{M}_0^{-1} \text{ onde} \quad (16)$$

$$\mathbf{M}_0 = \sum_{i=1}^N \Delta_r^t \hat{\mathbf{V}}_r \Delta_r \text{ e } \mathbf{M}_1 = \sum_{i=1}^N \Delta_r^t \hat{\mathbf{V}}_r^{-1} (\mathbf{Y}_r - \hat{\boldsymbol{\mu}}_r) (\mathbf{Y}_r - \hat{\boldsymbol{\mu}}_r)^t \hat{\mathbf{V}}_r^{-1} \Delta_r. \quad (17)$$

A implementação computacional de todas essas operações, foi possível utilizando-se o pacote GEE do software R Core Team (2006). Os resultados encontram-se descritos na seção seguinte.

3 Resultados e discussão

A determinação do melhor fotoperíodo, de agora em diante mencionado como tratamento, sendo este utilizado para criação de abelhas em laboratório, foi inferida por meio da análise de dados longitudinais, tendo em vista que, as respostas observadas ao longo do tempo foram repetidas em cada gaiola. Dessa forma, justificou-se a incorporação de uma estrutura de correlação que fosse contemplada pelas estimativas dos parâmetros, visando avaliar o efeito da dependência temporal na taxa de mortalidade das abelhas dentro de cada gaiola.

Com essa expectativa, procedeu-se à discussão dos resultados, inicialmente avaliando qual melhor preditor linear (Tabela 1) a ser considerado no modelo logit (2) descrito na seção anterior, baseando-se nos resultados da deviance e do critério do AIC encontrados. Importante ressaltar que, nesta etapa, por ser uma análise preliminar desconsiderou-se qualquer estrutura de correlação que supostamente pudesse explicar a dependência das observações repetidas ao longo do tempo verificadas nas gaiolas.

Os resultados encontrados na (Tabela 2) evidenciaram que o modelo logit, dado o preditor linear quadrático foi o mais adequado, em virtude de que o seu resultado foi mais expressivo em relação ao critério de AIC. O mesmo fato foi observado em relação à deviance, destacando a probabilidade da deviance com o valor de 0,1480; sendo esta maior que o nível de significância de 5%.

Tabela 2 - Resultados referentes à deviance e AIC provenientes das estimativas de máxima verossimilhança dos parâmetros do modelo logit com diferentes preditores lineares

Preditor	AIC	Deviance/gl	valor-p
(1) (Linear)	259,6	128,7/94	0,0101
(2) (Quadrático)	240,1	107,2/93	0,1480
(3) (Interação)	260,2	121,3/90	0,0155
(4) (Int. tempo ²)	265,5	126,6/90	0,0060

Com base nesses resultados, definiu-se então o modelo logit com o intuito de modelar o efeito das covariáveis na esperança marginal da variável resposta (DIGGLE, 2002) por

$$E(Y_{ijh}) = \frac{\exp(\beta_0 + \beta_h + \gamma T_j + \gamma T_j^2)}{1 + \exp(\beta_0 + \beta_h + \gamma T_j + \gamma T_j^2)} = \hat{p}_{ijh}, \text{ em que} \quad (19)$$

β_h indica o efeito do h-ésimo fotoperíodo ($h = 1, \dots, 5$); T_j é o j-ésimo tempo em dias.

As estimativas dos parâmetros do modelo (19) encontram-se descritas na Tabela 3, assumindo a independência de cada medida repetida observada nas gaiolas.

As estimativas de máxima verossimilhança dos parâmetros foram obtidas considerando que a variável independente, referente ao fator fotoperíodo, é classificatória. Por utilizar o software R na análise dos dados, mantendo-se a configuração padrão na qual utiliza-se a casela de referência sendo o primeiro nível do fator, a estimativa do parâmetro β_1 aparece confundida com a estimativa do intercepto, não sendo possível apresentar uma expressão isolada para tal parâmetro.

Baseando-se nos resultados encontrados na Tabela 3, questionou-se a significância detectada no parâmetro (γ), representando o tempo, no qual, sugere-se que a hipótese $H_0: \gamma = 0$ seja rejeitada. Em contrapartida a esse questionamento, realizou-se uma análise longitudinal com o propósito de novamente inferir sobre os parâmetros do modelo, porém, reconhecendo uma estrutura de correlação que representasse como essas medidas repetidas encontram-se correlacionadas. Para isso, conforme mencionado anteriormente, utilizou-se a técnica de estimação de equações generalizadas, conhecida como GEE (LIANG e ZEGGER, 1986).

ARTES e JORGENSEN (2000) comentam que, na estimação dessas equações, não se exige homocedasticidade; no entanto, caso os dados apresentem superdispersão, possivelmente algumas matrizes de covariâncias a serem estimadas poderão acarretar em matrizes não positivas definidas. Tendo em vista essa preocupação, procedeu-se então à seleção do modelo no qual a superdispersão fosse controlada.

Tabela 3 - Estimativas de máxima verossimilhança dos parâmetros do modelo logit considerando o preditor linear com efeito quadrático

Parâmetros	Estimativas	Erro Padrão	valor-p
β_0 (Intercepto)	-5,265	0,599	< 2e-16
β_1 (Trat 1)	-	-	-
β_2 (Trat 2)	1,259	0,414	0,00236
β_3 (Trat 3)	0,876	0,423	0,03844
β_4 (Trat 4)	0,999	0,428	0,01967
β_5 (Trat 5)	1,911	0,410	3,18e-06
γ (tempo)	0,081	0,017	1,69e-06
α (tempo ²)	-0,0005	0,0001	1,51e-05

As estimativas obtidas através da extensão do método de quase-verossimilhança se encontram descritas na Tabela 4, juntamente com os valores dos erros padrão robustos e o fator de escala (ϕ), sendo este último interpretado como estimativa pontual dos resíduos de Pearson obtidos pelo método logit com diferentes estruturas de correlação.

Os resultados encontrados na Tabela 4 correspondem à análise do modelo logit considerado três estruturas de correlação, que supostamente, poderão explicar a relação das medidas repetidas, referenciadas pela mortalidade das abelhas observadas dentro das gaiolas, sendo, portanto, incorporadas na estimação dos parâmetros do modelo. Nesse contexto, foram analisadas as seguintes estruturas: Permutável, AR(1) e M-dependente (1).

Avaliando-se os parâmetros de escala (ϕ), dado que seus resultados foram similares, estabeleceu-se uma dificuldade em determinar qual estrutura de correlação mais indicada para explicar a dependência destas medidas.

Com relação às estimativas dos parâmetros e dos erros padrões robustos foi verificado que, devido à proximidade dos valores obtidos, ficou evidenciada a não necessidade de pesquisar outra estrutura de correlação que relacione estas medidas. Assim sendo, determinou-se com segurança o tratamento referente à melhor condição para criação de abelhas em laboratório, tendo em vista que, os resultados discutidos

anteriormente, mostraram que a proporção média de mortalidade não apresentou uma variação expressiva para as diferentes estruturas de correlação avaliadas.

Tabela 4 - Estimativas dos parâmetros do modelo logit com diferentes estruturas de correlação.

Est.	Independente $\phi = 1,0589$		Permutável $\phi = 1,0729$		AR(1) $\phi = 1,05696$		M-Dependente (1) $\phi = 1,05691$	
	Est.	EPR	Est.	EPR	Est.	EPR	Est.	EPR
β_0	-5,265	2,802e-01	-5,295	0,281	-5,267	2,953e-01	-5,268	2,956e-01
β_2	1,259	3,036e-01	1,267	0,306	1,245	3,041e-01	1,244	3,040e-01
β_3	0,876	2,186e-01	0,877	0,215	0,854	2,227e-01	0,855	2,229e-01
β_4	0,999	1,879e-01	0,994	0,191	0,970	1,838e-01	0,972	1,834e-01
β_5	1,911	3,798e-01	1,924	0,388	1,913	3,754e-01	1,912	3,758e-01
γ	0,081	3,686e-03	0,082	0,0037	0,082	3,940e-03	0,082	3,948e-03
α	-0,0005	4,183e-05	-0,0005	0,00004	-0,0005	4,148e-05	-0,0005	4,151e-05

ϕ : Fator de escala; EPR: Erro padrão robusto; Est.: Estimativa.

Em outras palavras, a correlação temporal observada dentro de cada gaiola não afetou a taxa de mortalidade das abelhas. No entanto, o parâmetro relativo ao tempo no qual foi observado apresentou uma importante contribuição para construção do modelo, haja vista que, para todas as estruturas de correlação avaliadas, as estimativas dos parâmetros (γ) e respectivamente os erros padrões robustos foram próximos. Com base nesse resultado, procedeu-se à construção do gráfico, utilizando as proporções preditas pelo modelo, no qual se considerou a estrutura de correlação independente, apenas por uma questão de parcimônia.

Pela Figura 1 observou-se que o fotoperíodo que apresentou as menores proporções de mortalidade foi na situação em que as abelhas foram submetidas à ausência de luz (OL:24E), em todos os tempos avaliados. Portanto, recomenda-se que os experimentos laboratoriais com *A. mellifera* sejam feitos na ausência de luminosidade, pois nessa situação há evidências estatísticas de que as abelhas confinadas nas gaiolas apresentam uma taxa menor de mortalidade não influenciada pela morte observada de alguns indivíduos dentro das gaiolas ao longo do tempo. Tal recomendação confere com as orientações da OECD (1998) e do EPA (1996), sendo que, a não influência na mortalidade das abelhas, devido ao óbito de alguns indivíduos dentro da mesma gaiola experimental, só foi verificada graças à aplicação da análise longitudinal neste tipo de bioensaio.

As limitações verificadas nesse experimento, nas quais nos restringe a extrair conclusões mais amplas são ressaltadas em dois aspectos. O primeiro é o fato de que o número de abelhas mortas é diferente em cada instante de tempo, portanto, pode ser considerada uma variável aleatória.

O segundo aspecto refere-se às proporções de abelhas mortas, influenciadas pelo pequeno número de abelhas nas gaiolas, o que certamente influencia o modelo e pode ocasionar conclusões distorcidas. Para ilustrar tal situação, exemplificamos que num grupo de 10 abelhas, 1 morte representaria uma taxa fixa de mortalidade de 10%. No entanto, com o óbito de duas abelhas no tempo 1 (12h) e depois duas no tempo 2 (36h), a proporção de mortos seria de 25% neste instante. Note que, o número de abelhas mortas é

o mesmo. Assim sendo, a modelagem de proporções com poucas observações torna-se questionável e aberta a experimentos futuros, os quais utilizam modelos generalizados enfocando ou não o estudo longitudinal.

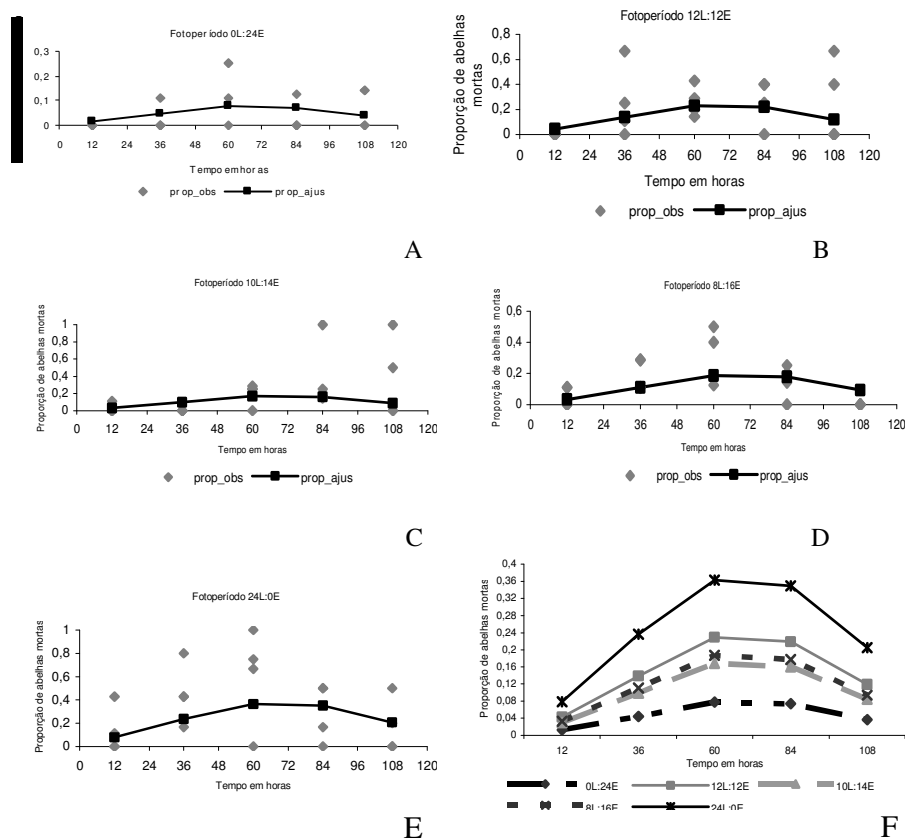


Figura 1 - Probabilidades observadas e ajustadas para cada fotoperíodo em função do tempo (A-E) e comparação dos fotoperíodos (F) considerando estrutura de correlação independente.

Conclusões

1. A técnica de equações de estimação generalizadas mostrou-se adequada para estudar a existência da dependência temporal para experimentos entomológicos.
2. A análise longitudinal realizada neste trabalho, não identificou uma estrutura de correlação, que explicasse uma possível dependência temporal provocada pela mortalidade de abelhas *Apis mellifera* confinadas dentro das mesmas gaiolas, ao longo do tempo.

3. Recomenda-se, para execução de experimentos laboratoriais com adultos de abelhas, o fotoperíodo com ausência de luz (0L:24E), por apresentar menores taxas de mortalidade.

BRIGHENTI, C. R. G.; CIRILLO, M. A.; BRIGHENTI, D. M. Longitudinal analysis in the determination of adequate photoperiod for bee breeding in laboratory. *Rev. Bras. Biom.*, São Paulo, v.26, n.3, p.111-124, 2008.

- **ABSTRACT:** *The appropriate exposition to the luminosity becomes necessary in order to increase the longevity of insects in the experiments at laboratory. In the biological trial with Apis mellifera each unit sample is constituted of groups of bees confined in the same cage, so the mortality of certain number of bees will be able to influence the mortality of the others. The deficiency in the literature of statistical techniques that provides an ideal experimental condition for the breeding of adult bees in group is also known. Due to the facts mentioned above, the present work had the objective of using a longitudinal analysis, in which, the purpose of verifying to temporary dependence effect in the mortality of bees, being those submitted to different photoperiod. The generalized estimate equations technique applied to the model logit were used, in which, the viability of incorporating the correlation structures to relate the mortality of the bees observed inside of each cage was evaluated along the time. It was concluded that the temporary dependence observed inside of the cages has no influence in the mortality of the A. mellifera for all of the considered photoperiod and that the treatment with the absence of light was the only one which presents the smaller mortality proportion during all of the evaluated time and this is the recommended.*
- **KEY-WORDS:** *GEE, dependence, correlation, longevity, Apis mellifera.*

Referências

- ARTES, R; JORGENSEN, A. Longitudinal data estimating equations for dispersion models. *Scand. J. Stat. Theory Appl.*, Stockholm, v.27, n.2, p. 321-334, 2000.
- ARGOLO, V. M; BUENO, V. H. P; SILVEIRA, L. C. P. Influência do Fotoperíodo na Reprodução e Longevidade de *Orius insidiosus* (Say) (Heteroptera: Anthracoridae) *Neotrop. Entomol.*, Londrina, v.31, n.2, p.257-261, 2002.
- BECK, S. D. *Insect photoperiodism*. 2. ed., New York: Academic Press, 1980. 387p.
- BLOCH, G; MESHI, A. Influences of octopamine and juvenile hormone on locomotor behavior and *period* gene expression in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol.* A, Berlin, v.193, n. 2, p.181-199, 2007.
- BLOCH, G; SHEMESH, Y; ROBINSON, G. E. Seasonal and task-related variation in free running activity rhythms in honey bees (*Apis mellifera*). *Insectes Soc.*, Paris, v.53, n.1, p.115-118, 2006.
- BRIGHENTI, D. M; CARVALHO, C. F; CARVALHO, G. A; BRIGHENTI, C. R. G; CARVALHO, S. M. Bioatividade do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner:1915) para adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). *Ciênc. Agrotecnol.*, Lavras, v.32, n.2, p.279-289, 2007.
- DIGGLE, P. J; HEAGERTY, P.; LIANG, K.Y.; ZEGER, S. L. *Analysis of longitudinal data*. 2. ed. Oxford University Press, New York, 2002. 379p.

- EPA. *Honey bee toxicity of residues on foliage* - OPPTS 850.3030 Ecological Effects Test Guidelines. 1996.
- FUCHIKAWA, T. E; SHIMIZU, I. Circadian rhythm of locomotor activity in the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*. *Physiol. Entomol.*, Oxford, v.32, n.1, p.73-80, 2007.
- GALVAN, T. L; KOCH, R. L; HUTCHISON, W. D. Effects of spinosad and indoxacarb on survival, development, and reproduction of the multicolored Asian lady. *Biol. Control.*, Orlando, v.34, n.1, p.108-114, 2005.
- GUNDERSEN-RINDAL, D. E; PEDRONI, M. J. Characterization and transcriptional analysis of protein tyrosine phosphatase genes and an ankyrin repeat gene of the parasitoid *lyptapanteles indiensis* polydnavirus in the parasitized host. *J. Gen. Virol.*, London, v.87, n.2, p.311-322, 2006.
- HAND, D.; CROWDER, M. *Practical longitudinal data analysis*. New York: Chapman & Hall, 1996. 232p
- HOOVER, S. E. R; HIGO, H. A; WINSTON, M. L. Worker honey bee ovary development: seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition. *J. Comp. Physiol. B*, Berlin, v.176, n.1, p.55-63, 2006.
- HUANG, L; XUE, F; WANG, G; HAN, R; GE, F. Photoperiodic response of diapause induction in the pine caterpillar, *Dendrolimus punctatus*. *Entom. Exp. Appl.*, Dordrecht, v.117, n.2, p.127-133, 2005.
- KRÜGER, R. F; RIBEIRO, P. B; CARVALHO, C. J. B. Desenvolvimento de *Ophyra albuquerquei* Lopes (Diptera, Muscidae) em condições de laboratório. *Ver. Bras. Entomol.*, São Paulo, v.47, n.4, p.643-648, 2003.
- LIANG, K. Y; ZEGER, S. L. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika*, London, v. 73, n.1, p.13-22, 1986.
- OECD. *Guideline 214: Honeybees, acute contact toxicity test* - OECD Guidelines for the testing of chemicals. 1998.
- PÉREZ, F. L; FREIRE, C. A. L. *Análise de dados longitudinais com aplicação na indústria*: relatório técnico. 2003. Disponível em: <<http://www.est.ufpr.br/rt/fl03.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2007.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R. *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2006. Disponível em: <<http://www.R-project.org>.Robinson, S>. Acesso em: 23 set. 2007.
- ROBINSON, S. J. W; PARTRIDGE, L. Temperature and climatic variation in larval growth efficiency in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.*. Basil, v.14, n.1, p.14-21, 2001.
- SAUNDERS, D. S; LEWIS, R. D; WARMAN, G. R. Photoperiodic induction of diapause: opening the black box. *Physiol. Entomol.*, London, v.29, n.1, p.1-15, 2004.
- SILVA, C. A. D. Efeitos da temperatura no desenvolvimento, fecundidade e longevidade de *Gargaphia torresi* Lima (Hemiptera, Tingidae). *Rev. Bras. Entomol.*, São Paulo, v.48, n. 4, p.547-552, 2004.
- SOUTHWICK, E. E. Physiology and social physiology of the honey bee. In: J.M. Graham (Ed). *The hive and the honey bee*. Dadant: Hamilon, 1992. 295p.
- SUWA, A; GOTOH, T. Geographic variation in diapause induction and mode of diapause inheritance in *Tetranychus pueraricola*. *J. Appl. Entomol.*, Berlin, v.130, n.5, p.329-335, 2006.

VENEZUELA, M. K. *Modelos lineares generalizados para análise de dados com medidas repetidas*. 2003. 108f. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agronômica) - Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2003.
YANG, K.H; CHANG, Y.C. A note on model diagnostics in longitudinal data analysis. *Comput. Stat.*, Helderberg, v.21, p.571-587, 2006.

Recebido em 27.05.2008.

Aprovado após revisão em 23.09.2008.