

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Determinantes do comportamento forrageador de *Melipona scutellaris*

Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)”

Ana Carolina Roselino

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP,  
como parte das exigências para a obtenção do  
título de Doutor em Ciências, Área: Entomologia.

Ribeirão Preto

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Determinantes do comportamento forrageador de *Melipona scutellaris*

Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)”

Ana Carolina Roselino

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Zucchi

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP,  
como parte das exigências para a obtenção do  
título de Doutor em Ciências, Área: Entomologia.

Ribeirão Preto

2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

Roselino, Ana Carolina

Determinantes do comportamento forrageador de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Ribeirão Preto, 2009.

126p. il.: 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à FFCLRP – Departamento de Biologia /USP. Área de concentração: Entomologia.

Orientador: Zucchi, Ronaldo.

1. *Melipona scutellaris*.
2. Cognição.
3. Sinal químico.
4. Feromônio.
5. Macro-glomérulo.

**Às crianças**

*Luiz Henrique e Ana Clara*

*“Quem convive muito com crianças descobre que nenhuma  
ação externa sobre elas permanece sem uma ação recíproca”*

(Johann Wolfgang Goethe)

## **Agradecimentos**

À Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pelo apoio e oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – n° 142905/2005-4) pela bolsa de doutorado concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estágio no exterior (PDEE - n° 439107-1).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – n° 06/50809-7) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Zucchi, pela consideração, confiança, amizade.

Dr. Michael Hrcir pelo carinho, amizade, respeito e generosidade.

Dr. Martin Giurfa pelo desafio, confiança e amizade.

Dr. Jean-Christophe Sandoz pelo estímulo, respeito e amizade.

Dr. Sidnei Mateus pelo respeito, sugestões, disponibilidade e amizade.

Aos professores e funcionários que pude contar durante este trabalho, Profa. Dra. Vera Lucia Imperatriz-Fonseca, Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, Sra. Secretária Renata Aparecida de Andrade Cavallari, Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo, Dr. Tiago Maurício Franco.

Aos amigos, Solange, Sérgio, Fabrício, Rogério, Michelle, Gustavo, Gesline, Selma, Veronika, Dirk, Stefan, Laura, Ivelize, Fábio e Eunice.

Aos professores, funcionários e colegas de laboratório que suavizaram a rotina científica e que me ajudaram em algum momento deste trabalho.

Ao Theo Rolla Paula Mota, meu grande amigo! Faltam-me palavras para te agradecer...

Ao Benoît Hourcade, pela atenção especial, generosidade e amizade no laboratório francês.

Aos professores, funcionários e colegas do Centre de Recherche sur la Cognition Animale (CRCA – Université Paul Sabatier, Toulouse/FR) que fizeram parte do ano mais feliz da minha vida e por dividirem generosamente comigo seu ambiente de trabalho e seus conhecimentos.

À minha Família pelo mais importante apoio.

## Sumário

Lista de Figuras .....	x
Lista de Tabelas.....	xv
Resumo .....	xvi
Abstract.....	xviii
Introdução Geral.....	20
Objetivos Gerais.....	25
Material e Métodos Gerais .....	26
Capítulo 1 .....	33
1.1. Introdução.....	33
1.2. Material e Métodos.....	37
1.2.1. Equipamentos .....	37
1.2.2. Coleta e Preparação das Abelhas.....	40
1.2.3. Pré-teste .....	41
1.2.4. Teste de Inclusão de Abelhas no Grupo Experimental - Reflexo de Extensão da Probóscide (PER) .....	42
1.2.5. Posicionamento das Abelhas no Ambiente Experimental.....	42

1.2.6. Condicionamento Clássico Olfatório: Reflexo de Extensão da Probóscide – PER (CS+) .....	42
1.2.7. Condicionamento Clássico Olfatório: Reflexo de Extensão da Probóscide – PER (CS-) .....	44
1.2.8. Teste de Memória de Curto Prazo .....	44
1.2.9. Teste de Escolha do Alimentador: Tomada de Decisão .....	44
1.2.10. Grupo Controle .....	45
1.2.11. Análise Estatística .....	45
1.3. Resultados.....	46
1.3.1. Pré-teste .....	46
1.3.2. Teste de Inclusão de Abelhas no Grupo Experimental.....	46
1.3.3. Condicionamento Clássico Olfatório (CS+).....	47
1.3.4. Teste de Memória de Curto Prazo (CS+) .....	48
1.3.5. Teste de Escolha do Alimentador (Tomada de Decisão) (CS+).....	49
1.3.6. Condicionamento Clássico Olfatório (CS-).....	51
1.3.7. Teste de Escolha do Alimentador (Tomada de Decisão) (CS-).....	52
1.4. Discussão .....	54
1.5. Conclusões.....	58

Capítulo 2 .....	59
2.1. Introdução.....	59
2.2. Material e Métodos.....	62
2.2.1. Equipamentos .....	62
2.2.2. Treinamento das Abelhas .....	63
2.2.3. Preparação do <i>Setup</i> (Condicionamento Contextual 1 e 2).....	64
2.2.4. Condicionamento Contextual 1: Associação entre SQ e Ausência de + = Efeito Repelente .....	64
2.2.5. Condicionamento Contextual 2: Associação entre SQ e Aumento na Concentração + (+ <sup>+</sup> ) = Efeito Atraente .....	64
2.2.6. Teste de Contextualização 1 e 2 .....	65
2.2.7. Grupo Controle.....	65
2.2.8. Análise Estatística .....	66
2.3. Resultados.....	67
2.3.1. Condicionamento Contextual 1: Associação entre SQ e Ausência de + = Efeito Repelente .....	67
2.3.2. Teste de Contextualização 1 .....	68
2.3.3. Condicionamento Contextual 2: Associação entre SQ e Aumento na Concentração + (+ <sup>+</sup> ) = Efeito Atraente .....	69

2.4. Discussão .....	72
2.5. Conclusões.....	75
Capítulo 3 .....	76
3.1. Introdução.....	76
3.2. Material e Métodos.....	81
3.2.1. Procedimentos Neuro-anatômicos .....	81
3.2.2. Aplicação do Marcador Fluorescente .....	81
3.2.3. Microscopia Confocal de Escaneamento Laser e Reconstrução Tri-dimensional ....	82
3.2.4. Análise dos Dados .....	84
3.2.5. Análise Estatística .....	85
3.3. Resultados.....	86
3.4. Discussão .....	96
3.5. Conclusões.....	101
Referências Bibliográficas.....	102
ANEXO I.....	125
Material e Métodos.....	125
Preparação das Abelhas .....	125

Coleta de Dados..... 125

Análise dos Dados ..... 126

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Representação esquemática do livre acesso das abelhas ao ambiente externo. Laboratório de Ecologia e Zoologia de Invertebrados, no Departamento de Biologia do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo..... 26
- Figura 2.** (A) Modelo de identificação das abelhas. Os círculos rosa representam o tórax das abelhas no eixo de orientação rostro-caudal. Os círculos menores em cores variadas correspondem à numeração que identifica as abelhas individualmente, por exemplo, (B) a abelha de número 57 recebeu uma marca azul do lado esquerdo superior (representa o número 50) e uma verde no superior direito (representa o número 7). As marcas são feitas com tinta plástica e palito de dente sobre o tórax das abelhas. .... 27
- Figura 3.** Curva de Sobrevivência ( $l_x$ ) e Curva de Mortalidade ( $d_x$ ) para *Melipona scutellaris*.  $l_x$  – número de indivíduos vivos em cada intervalo de idade;  $d_x$  – número de indivíduos mortos em cada intervalo de idade. A direita da linha tracejada corresponde ao período da atividade de forrageamento. .... 32
- Figura 1.1.** Liberador de odores (Insight<sup>®</sup>). Equipamento que libera o fluxo de ar utilizado como carreador de odor durante o condicionamento clássico olfatório. (A) Cronômetro ajustável, com display digital; (B) 2 bombas de ar (internas) (Big Air A420<sup>®</sup>) e 2 ductos de passagem de ar; (C) compartimento onde se coloca um papel filtro com a solução de odor.... 37
- Figura 1.2.** Ambiente experimental (*setup*) composto por (A) Liberador de odor, com os ductos de saída de ar e compartimento para filtro com odor, (B) base para posicionar a abelha e, (C) exaustor para garantir a não saturação do ar..... 38
- Figura 1.3.** Caixa de Teste para realização do Teste de Tomada de Decisão. Caixa de acrílico branco, com tampa de acrílico transparente. Dimensões: 60 cm de comprimento x 50 cm de largura x 25 cm de altura. (A) Linalool e US = CS<sup>l</sup> +, (B) US e, (C) Geraniol e US = CS<sup>g</sup> +. .... 39

**Figura 1.4.** Modelo de alimentador de acrílico usado dentro da Caixa de Teste para Teste de Tomada de Decisão. Dimensões: 3,0 x 3,0 x 0,5 cm<sup>3</sup>, com um orifício central, onde se coloca a solução de sacarose de 0,5 cm de diâmetro e 0,3 cm de profundidade. .... 39

**Figura 1.5.** Operária de *Melipona scutellaris* contida em suporte de metal com fita adesiva. As antenas e peças bucais permanecem livres para realização de Condicionamento Clássico Olfatório através do Reflexo de Extensão da Probóscide (PER). .... 41

**Figura 1.6.** Descrição do protocolo temporal do Condicionamento Clássico Olfatório. (A) indica a linha de tempo que ocorre o condicionamento completo. Cada losango preto sobre a linha do tempo indica uma trilha do condicionamento (B). Os triângulos sobre a linha se referem ao Teste de Memória de Curto Prazo em 1' e 6'(C). .... 43

**Figura 1.7.** Reflexo de Extensão da Probóscide a diferentes concentrações de solução de sacarose (5%, 15%, 25%, 35%, 45%, 55%, 65%). O controle (Ct) foi realizado com a apresentação de água entre as apresentações de sacarose. (N = 101). .... 46

**Figura 1.8.** Condicionamento Clássico Olfatório. Porcentagem de respostas à CS durante os 3 primeiros segundos da apresentação de odor durante cada trilha do condicionamento (%PER). Nenhuma abelha demonstrou aquisição para os dois odores. Linalool - CS<sup>l</sup> (círculo vazado, N = 70) e Geraniol - CS<sup>g</sup> (triângulo preenchido, N = 70). .... 47

**Figura 1.9.** Condicionamento Clássico Olfatório. Porcentagem de abelhas que responderam à solução de sacarose nos 3 segundos finais da apresentação do estímulo de odor (%UR). Linalool - CS<sup>l</sup> + (círculo vazado, N = 70) e Geraniol - CS<sup>g</sup> + (triângulo preenchido, N = 70). .... 48

**Figura 1.10.** Teste de Memória de Curto Prazo. Porcentagem de abelhas que responderam com o reflexo de extensão da probóscide para o estímulo de odor. Linalool - CS<sup>l</sup> + (círculo, N = 70) e Geraniol - CS<sup>g</sup> + (triângulo, N = 70). .... 49

**Figura 1.11.** Teste de Escolha do Alimentador (Tomada de Decisão). (A) Grupo controle (N = 65): escolha espontânea de abelhas forrageadoras inexperientes por 1 entre 3 alimentadores disponíveis na caixa de teste. (B) Grupo condicionado por Linalool (N = 70):  $\approx 50\%$  das abelhas se dirigiram para o alimentador que continha papel filtro embebido em solução de Linalool (*Qui-quadrado*:  $X^2 = 7,65$  ( $P < 0,05$ )). (C) Grupo condicionado por Geraniol (N = 70):  $50\%$  das abelhas se dirigiram para o alimentador que continha papel filtro embebido em solução de Geraniol (*Qui-quadrado*:  $X^2 = 13,57$  ( $P < 0,05$ )). L = Linalool, G = Geraniol, S = Sacarose..... 51

**Figura 1.12.** Condicionamento Clássico Olfatório (CS-). Porcentagem de respostas à CS durante 6 segundos de apresentação de odor durante cada trilha do condicionamento (%PER). Nenhuma abelha reagiu com a extensão da probóscide para o Linalool CS<sup>l</sup> - (círculo vazado, N = 30) e para o Geraniol CS<sup>g</sup> - (triângulo preenchido, N = 30)..... 52

**Figura 1.13.** Teste de Escolha do Alimentador (Tomada de Decisão). Teste realizado com abelhas que passaram pelo condicionamento sem reforço, CS-. (A) Linalool (N = 30): *Qui-quadrado*,  $X^2 = 9,8$  ( $P < 0,05$ ). (B) Geraniol (N = 30):  $X^2 = 5,4$  ( $P > 0,05$ ). L = Linalool, G = Geraniol, S = Sacarose..... 53

**Figura 2.1.** (A) Alimentador de acrílico com papel cartão azul e cobertura de acrílico (3,0 x 3,0 x 0,5 cm) usado para compor o arranjo de alimentadores usado durante o Condicionamento. (B) Arranjo de alimentadores numa matriz 3 x 3..... 62

**Figura 2.2.** Condicionamento Contextual 1: associação entre sinal químico (SQ) e ausência de alimento - Efeito Repelente (N = 30). A reta representa a probabilidade de uma abelha encontrar um alimentador não marcado a cada visita, se a cada visita a abelha marcar 1 novo alimentador. A reta com círculos vazios representa a probabilidade de ter alimentadores marcados a cada volta da abelha ao *setup*. O círculo cheio representa porcentagem real de escolha por alimentadores não marcados = Curva de Aprendizagem..... 68

**Figura 2.3.** Tc1: Teste de Contextualização 1 (N = 30), número de abelhas que escolheram pelo alimentador SSQ durante a segunda visita ao *setup* (*Qui-quadrado*:  $X^2 = 6,53$ ,  $P = 0,01$ ). Controle: Grupo controle (N = 23), número de abelhas que escolheram por um dos alimentadores (SSQ ou SQ) sem terem passado pela fase de condicionamento. Comparação: Porcentagem de escolha das abelhas pelo alimentador não marcado (SSQ) durante Teste de Contextualização 1 e no Grupo controle (*Fisher's Exact Probability Test*,  $P = 0,05$ ). SSQ: alimentador sem sinal químico, SQ: alimentador com sinal químico, SSQt: alimentador sem sinal químico – proporção do grupo teste, SSQc: alimentador sem sinal químico – proporção do grupo controle..... 69

**Figura 2.4.** Condicionamento Contextual 2: associação entre sinal químico (SQ) e aumento na concentração de sacarose do alimento (+<sup>+</sup>) – Efeito Atraente (N = 30). A reta representa a probabilidade de uma abelha encontrar 1 alimentador marcado, se a cada visita a abelha marcar 1 novo alimentador. A reta com círculos vazios representa a probabilidade de ter alimentadores marcados a cada volta da abelha ao *setup*. O círculo cheio representa porcentagem real de escolha por alimentadores marcados = Curva de Aprendizagem. .... 70

**Figura 2.5.** Tc2: Teste de Contextualização 2 (N = 30), número de abelhas que escolheram pelo alimentador SSQ durante a segunda visita ao *setup* (*Qui-quadrado*:  $X^2 = 4,8$  ( $P = 0,02$ )). Controle: Grupo controle (N = 30), número de abelhas que escolheram por um dos alimentadores (SSQ ou SQ) sem terem passado pela fase de condicionamento. Comparação: Porcentagem de escolha das abelhas pelo alimentador marcado (SSQ) durante Teste de Contextualização 2 e no Grupo controle (*Fisher's Exact Probability Test*,  $P = 0,05$ ). SSQ: alimentador sem sinal químico, SQ: alimentador com sinal químico, SQt: alimentador com sinal químico – proporção do grupo teste, SQc: alimentador com sinal químico – proporção do grupo controle. .... 71

**Figura 3.1.** Microscópio Confocal Laser (Leica TCS SP5). *Plateforme de imagerie - Centre de Biologie du Développement* (CBD - IFR109) da Université Paul Sabatier – Toulouse III, Toulouse, França..... 83

**Figura 3.2.** *Software* AMIRA 3.0. Logicial cedido pela *Plateforme de imagerie - Centre de Biologie du Développement* (CBD - IFR109) da Université Paul Sabatier – Toulouse III, Toulouse, França. .... 84

**Figura 3.3.** Imagem do lobo antenal de *Melipona scutellaris* (operária forrageadora – lado esquerdo). (A) A qualidade das preparações permite identificar os limites glomerulares, indicados pelas setas. (B) Em certas posições os glomérulos são muito próximos uns dos outros impossibilitando a identificação exata da quantidade de glomérulos, fato que resultou em variação no número total de glomérulos entre os lobos analisados. As setas indicam glomérulos que estão sobrepostos. Escala em A = 100 $\mu$ m (aplicada em B). ..... 86

**Figura 3.4.** Seqüência de imagens do lobo antenal de forrageadora de *Melipona scutellaris*. Z indica a seção de 2  $\mu$ m em relação ao total de imagens feitas (138). Os números sobre os glomérulos representam a contagem total e também serviram na identificação. Os números de valores mais baixos são referentes aos glomérulos dorsais e os números maiores aos glomérulos ventrais. Em C e D temos os *tracti* principais, T1 e T2. AN = nervo antenal. MG = macro-glomérulo. Escala em A = 100 $\mu$ m (aplicada de A a L)..... 88

**Figura 3.5.** Seqüência de imagens do lobo antenal de forrageadora de *Melipona scutellaris* para identificação dos *tracti* que inervam os clusteres glomerulares. Marcação anterógrada com cristais de rodamina. Z indica a seção de 2  $\mu$ m em relação ao total de imagens feitas (213). T1, T2, T3, T4, T5, T6: *tracti* identificados provenientes do nervo antenal. AN = nervo antenal. MG = macro-glomérulo. Escala em A = 100 $\mu$ m (aplicada de A a I). ..... 89

**Figura 3.6.** Reconstrução tridimensional de um lobo antenal de *Melipona scutellaris* (forrageadoras). AN: Nervos Antenais, MG: Provável macro-glomérulo e, em azul os demais glomérulos mapeados. .... 94

**Figura 3.7.** Distribuição dos glomérulos relativa ao volume. Os *box plot* representam a grande maioria de glomérulos através do número médio de glomérulos e o desvio padrão. Os círculos vazios são alguns glomérulos que se separam dos demais, e os **x** representam os macro-glomérulos. A linha tracejada é a metade do volume representado no eixo y. Esquerdo = lobo antenais esquerdos e, Direitos = lobos antenais direitos. Cada letra igual representa um par de lobos, esquerdo e direito, do mesmo cérebro..... 95

## Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Tabela de vida de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). .. 30
- Tabela 3.1.** Somatório de Glomérulos (média  $\pm$  desvio padrão), Volume Total (média  $\pm$  desvio padrão), Volume Maior e Volume Menor encontrados dos lobos antenais de *Melipona scuttellaris* analisados com o suporte do *software* AMIRA 3.0<sup>®</sup> ..... 87
- Tabela 3.2.** Distribuição glomerular em intervalos de  $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ . Número de glomérulos que compõem cada intervalo (média  $\pm$  desvio padrão). A análise volumétrica dos lobos antenais de *Melipona scutellaris* (forrageadoras) foi analisada com o suporte do *software* AMIRA 3.0<sup>®</sup>. \*valores inteiros. Entre parênteses: porcentagens que os glomérulos destes intervalos contribuem para o número total de glomérulos. Abaixo das linhas tracejadas estão os macro-glomérulos. .... 91
- Tabela 3.3.** Distribuição glomerular em intervalos de  $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ . Volume (média  $\pm$  desvio padrão) do grupo de glomérulos que compõem cada categoria. A análise volumétrica dos lobos antenais de *Melipona scuttellaris* (forrageadoras) foi analisada com o suporte do *software* AMIRA 3.0<sup>®</sup>. \*valores inteiros. Entre parênteses: porcentagens que os glomérulos destes intervalos contribuem para o volume total. Abaixo das linhas tracejadas estão os volumes dos macro-glomérulos. .... 92
- Tabela 3.4.** Estudo volumétrico dos glomérulos hipertrofiados em operárias forrageadoras de *Melipona scutellaris*. (A) Volume macroglomerular Esquerdo e Direito (N = 7) e a média destes valores. .... 93
- Tabela 3.5.** Contribuição do volume do macro-glomérulo (%) no volume total de cada lobo antenal analisado. .... 94

## Resumo

ROSELINO, A.C. **Determinantes do comportamento forrageador de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2009. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Palavras-chave: *Melipona scutellaris*, Cognição, Sinal químico, Feromônio, Macro-glomérulo.

Em insetos sociais, forragear por alimento é um dos mais importantes processos biológicos, uma vez que os indivíduos precisam forragear para coletar alimentos para sustentar a si próprios e aos seus companheiros de ninho. As abelhas sociais, como as abelhas sem ferrão, são um excelente exemplo para estudar a complexidade deste comportamento com características multifatoriais. A idade, o genótipo, a experiência prévia e limiares de respostas específicas individuais, bem como os fatores ambientais, são parâmetros que modulam o início, a continuidade e o fim do processo de forrageamento. Com o objetivo de elucidar a importância dos odores nas decisões de forrageamento da abelha sem ferrão, *Melipona scutellaris*, abordei as três questões que seguem: (1) As forrageadoras utilizam informação de odor anteriormente aprendida quando procuram por alimento? (2) De que maneira as próprias marcas químicas influenciam nas decisões do forrageamento? (3) Qual é a base neuro-anatômica para a percepção de odor em abelhas sem ferrão? (1) Durante a coleta por alimento, o odor das flores age como um estímulo para as abelhas, quando pareado com o néctar/sacarose, potencialmente resulta na formação do aprendizado associativo. Esta experiência é crucial para a forrageadora decidir se retorna e com que frequência retorna para uma fonte de alimento. Embora, as forrageadoras de *M. scutellaris* não mostraram aquisição através do protocolo de reflexo de extensão da probóscide estabelecido para as abelhas melíferas, as forrageadoras usaram a experiência prévia de uma informação de odor quando deviam escolher entre fontes de

alimento. (2) Além disso, certas espécies de abelhas sem ferrão usam feromônios para comunicar a localização específica de uma fonte de alimento, as abelhas coletoras deixam um odor particular (pista química com origem na glândula dos tendões) na fonte de alimento durante suas visitas. Quando a abelha retorna ao mesmo local, ela pode usar esta informação química para decidir se visita novamente a fonte ou se desiste, e procura por outra fonte de alimento. Dependente do contexto da experiência prévia, as forrageadoras de *M. scutellaris* usaram as próprias marcas de odor para evitar flores já visitadas (alimentadores artificiais) ou revisitaram flores que aumentaram em lucratividade depois da primeira visita. (3) O pré-requisito para a percepção e conseqüentemente, para o uso da informação olfatória, é um aparato neurológico adequado para detectar e processar a informação química. O estudo neuro-anatômico do lobo antenal de *M. scutellaris* revela que a estrutura central olfatória destas abelhas é muito diferente das abelhas melíferas. Surpreendentemente, as forrageadoras de *M. scutellaris* possuem um macro-glomérulo, o qual é o primeiro macro-glomérulo descrito em operárias da família Apidae. Esta estrutura particular do lobo antenal está potencialmente envolvida no processamento de feromônios (sinais químicos) que têm função crucial nas atividades de forrageamento e defesa do ninho em uma colônia de abelha sem ferrão.

## Abstract

ROSELINO, A.C. **Determinants of the foraging behavior of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2009. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Keywords: *Melipona scutellaris*, Cognition, Chemical signal, Pheromone, Macro-glomerulus.

In social insects, the foraging for food is one of the most important biological processes, since foraging individuals need to collect food to sustain themselves and their not-foraging nestmates. Social bees, such as stingless bees, are an excellent example to study the complexity of the multi-factorial traits of foraging behavior. Age, genotype, previous experience, and the specific response threshold of an individual, as well as environmental factors, are parameters that modulate the onset, the continuity, and the end of foraging processes. In order to elucidate the importance of scents for the foraging decisions of stingless bees, *Melipona scutellaris*, I addressed the following three questions. (1) Do foragers make use of previously experienced scent information when searching for food? (2) In which way do the bees' own scent marks influence their foraging decisions? (3) What is the neuro-anatomical basis for scent perception in stingless bees? (1) During food collection, floral odors act as a stimulus for the bees, which, when paired with a nectar/sucrose reward, potentially results in the formation of a learned association. This experience is crucial for a forager's decision whether and how often to return to a food source. Although *M. scutellaris* foragers did not show scent-learning in the proboscis-extension-reflex (PER) protocol, established for honey bees, the bees made use of previously experienced scent information when choosing between food sources. (2) In addition pheromone signals that some species of stingless bees use to communicate the specific location of a food source, collecting bees leave a particular odor (chemical cue

from the tendon glands) at food sources during their visits. When a bee returns to the same place, it can make use of this chemical information to decide whether to visit the source again or to give up and search for a new source. Depending on the previously experienced context, foragers of the stingless bee *M. scutellaris* used their own scent marks either to avoid already visited and depleted "flowers" (artificial feeder) or to revisit "flowers" that increase in profitability after the first visit. (3) The prerequisite for scent perception and, consequently, for the use of olfactory information, is an adequate neurological apparatus to detect and process chemical information. The neuro-anatomical study of the antennal lobe of *M. scutellaris* revealed that the structure of the bees' olfactory center is strikingly different from what is known from honey bees. Most surprisingly, *M. scutellaris* foragers possess a macro-glomerulus, which is the first macro-glomerulus described in workers of the Apidae family. This particular structure of the antennal lobe is potentially involved in processing pheromone compounds (chemical signals) that play a crucial role in colony activities such as foraging and nest defense in stingless bees.

## **Determinantes do Comportamento Forrageador de *Melipona scutellaris***

### **Introdução Geral**

O comportamento forrageador é o melhor exemplo estudado entre os processos organizados nos insetos sociais, e serve como referência para explicar ou entender outros processos comportamentais (Giraldeau, 1997). Além disso, é um modelo ideal para estudar a influência de parâmetros ecológicos, a evolução de mecanismos fisiológicos e sensoriais nos grupos dos insetos sociais.

Como as abelhas melíferas, as abelhas sem ferrão desenvolveram uma avançada organização social (Michener, 1974). A divisão de trabalho e a especialização de indivíduos em diferentes tarefas são fenômenos complexos que ocorrem em muitas sociedades de insetos (Merkle & Middendorf, 2004). Na vida de uma abelha operária (Apini, Meliponini, Bombini) ocorrem sucessivas mudanças de tarefas (Michener, 1974) que podem ser explicadas através do modelo de limiar de resposta individual aos estímulos de cada tarefa (Bonabeau *et al.*, 1996; 1998). No caso das abelhas, as operárias mais jovens executam tarefas dentro do ninho, e as abelhas mais velhas tornam-se forrageadoras. Esta mudança na execução das tarefas de dentro para fora do ninho é a mudança mais importante na ontogenia destes organismos (Pankiw & Page, 1999).

Nas abelhas sem ferrão, como em outros insetos sociais, não são todos os indivíduos da colônia que saem para forragear, entretanto, o número de indivíduos que coletam alimento deve ser o suficiente para acumularem nutrientes para o desenvolvimento da população do ninho (Jarau & Hrncir, 2009). A exploração eficiente das fontes alimentares é decisiva para a sobrevivência das colônias, que buscam equilibrar o fluxo de entrada de alimento através do ajuste das decisões individuais e de estratégias ecológicas

relacionadas às condições ambientais. Para efetuar esses ajustes, a organização e a coordenação efetiva das operárias são indispensáveis (Farber *et al.*, 1999; Daly *et al.*, 2004; Biesmeijer & Slaa, 2004).

Vários mecanismos de comunicação evoluíram para transferir informações entre as operárias sobre a natureza e o local das fontes de alimento para melhorar a eficiência do forrageio (Nieh, 2004; Barth *et al.*, 2008; Hrncir, 2009; Jarau, 2009). Os sinais químicos são de grande importância neste contexto e podem ser transferidos para a colônia pelo odor do alimento retido no corpo da operária que retorna ao ninho (Lindauer, 1956; Jarau, 2009; Reinhard & Srinivasan, 2009). O odor do recurso alimentar age no recrutamento de mais indivíduos e na constância da coleta (Slaa *et al.*, 1998). Mas, antes da abelha sair pela primeira vez da colônia e encontrar uma fonte de alimento, as futuras forrageadoras precisam distinguir seu alimento entre tudo o que existe e, que é novo fora do ninho (Simonds & Plowright, 2004).

A habilidade de perceber odores, cores, forma das flores, manifestada nas abelhas melíferas, revela características do aprendizado associativo descrito também em mamíferos (Menzel, 1990; 1999; Menzel & Müller, 1996). Estes estímulos são aprendidos quando as abelhas os experimentam logo antes de entrarem em contato com o alimento (pólen e néctar), que agem como reforço para estes estímulos (Hammer & Menzel, 1995). Provavelmente, existe uma comunicação cíclica entre as abelhas que já foram forragear e as operárias que ainda estão trabalhando no ninho e, neste caso, as informações de odor, por exemplo, podem ser passadas de uma abelha polinizadora para outra em alguma das idades em que realizam funções dentro da colônia (Dukas & Real, 1993; Gerber *et al.*, 1996). Segundo Farina *et al.* (2006) e Farina & Grüter (2009) as operárias receptoras de néctar recebem informações sobre a fonte de alimento via trofalaxia com as abelhas

coletoras, e assim estabelecem uma associação entre um odor e a possível fonte de carboidrato.

Em um contexto natural, as abelhas aprendem e memorizam os locais de interesse, que são essencialmente, o ninho e as fontes de alimento (Menzel *et al.*, 1993; Hammer & Menzel, 1995; Giurfa, 2007). No caso das fontes de alimento, o aprendizado e a memória são as bases para o comportamento que gera a constância floral, que consiste em uma abelha visitar uma única espécie de flor, durante o tempo em que esta se apresentar lucrativa (Frisch, 1967; Dukas & Real, 1993; Chittka *et al.*, 1999). Assim como *Apis mellifera*, as abelhas sem ferrão passam parte de sua trajetória de vida coletando alimento para prover a colônia. O início e a continuidade deste comportamento etário-dependente (Robinson, 1992; Wakano *et al.*, 1998; Ben-Shahar *et al.*, 2002) são influenciados por fatores genéticos (Robinson & Page, 1989) e fisiológicos baseados nos limiares individuais de respostas comportamentais à estímulos do ambiente (Robinson, 1987; Blom 1993; Bonabeau *et al.*, 1996; 1998). Os limiares são alterados constantemente, de acordo com o acúmulo de experiência (Dukas & Real, 1993; Pankiw & Page, 1999; Laloï *et al.*, 2001). A integração das informações internas, como a memória do indivíduo e, externas (odor, cor, forma, lucratividade e posição relativa das fontes de alimento) dirigem a tarefa de forragear (Raveret-Richter & Waddington, 1993).

A ativação e a modulação do comportamento forrageador estão ligadas a capacidade que o sentido olfativo dos insetos forrageadores (e.g. *A. mellifera*) tem para detectar uma vasta gama de odores através dos receptores de estímulos, as antenas e os tarsos (Farber *et al.*, 1999; Daly *et al.*, 2004). O sistema olfativo das abelhas e de certos vertebrados é constituído por estruturas homólogas filogeneticamente, lobo antenal e bulbo olfativo, respectivamente (Hildebrand & Shepherd, 1997), que são responsáveis em processar as informações químicas do meio externo nos centros superiores do cérebro

(Martin & Jessell, 1995; Freeman, 1999). Tal homologia nos permite fazer comparações e estender os princípios encontrados em uma classe para outra (Davis, 2004).

Nos insetos, estruturas esféricas, os lobos antenais, situadas no deutocérebro, recebem informações sensoriais através dos neurônios de recepção olfatória (ORN) que estão presentes nas antenas e peças bucais (Hansson & Anton, 2000). A organização anatômica e fisiológica do lobo e os elementos neuronais têm características semelhantes enquanto centro olfatório primário em vários organismos no reino animal. Os lobos antenais dos insetos são constituídos por estruturas neuropilares esferoidais, chamados glomérulos. Em cada glomérulo são formados os contatos sinápticos entre os receptores olfatórios das antenas que enviam suas projeções até o cérebro. Os inter-neurônios e os neurônios de projeção, emitem as informações dos lobos antenais para os principais centros cerebrais, os *mushroom bodies/corpora pedunculata* e o protocérebro lateral (Abel *et al.*, 2001). O arranjo e o número de glomérulos em um lobo antenal são específicos para cada espécie (Arnold *et al.*, 1985; Flanagan & Mercer, 1989; Galizia *et al.*, 1999; Hansson & Anton, 2000). Cada estímulo olfatório incita um padrão exato espaço-temporal de ativação glomerular, que pode ser verificado através do uso de técnicas de imagens com cálcio fluorescente, que mede a atividade neural intracelular (Joerges *et al.*, 1997; Galizia *et al.*, 1999; Galizia & Menzel, 2000) e que é idêntico entre os indivíduos de mesma espécie. Sabe-se também, que estímulos olfatórios similares ativam áreas similares do lobo antenal (Joerges *et al.*, 1997; Guerrieri *et al.*, 2005). Os estudos de neuro-anatomia funcional, ao nível do lobo antenal são também importantes para descobrir especializações do sistema olfatório. Por exemplo, glomérulos hipertrofiados (complexo macroglomerular) (Sandoz, 2006), onde se processam alguns componentes de feromônio sexual. A capacidade de alguns insetos em processar a informação de um feromônio específico é

uma forma de garantir sigilo, por exemplo, sobre a localização de uma fonte de alimento evitando competição, de encontrar parceiros sexuais, de evitar inimigos naturais.

Embora para alguns, o tema cognição animal, não seja considerado como o ponto forte dos insetos devido ao seu comportamento altamente estereotipado, com os circuitos neurais sob rigoroso controle genético, os insetos sociais, em especial as abelhas, apresentam um repertório comportamental diverso, com alto nível de organização social, e adaptações para defender o ninho, forragear, e orientar-se espaço-temporalmente. Tais atividades estão evolutivamente relacionadas com a habilidade de aprender e de memorizar informações ambientais (Hammer & Menzel, 1995; Collett & Collett, 2002; Benard *et al.*, 2006; Giurfa, 2003; 2007). Portanto, este trabalho de tese selecionou o comportamento forrageador de uma espécie de abelha sem ferrão, *Melipona scutellaris*, por este ser um comportamento complexo que envolve suas estratégias ecológicas, capacidades cognitivas e especialização dos mecanismos sensoriais para a "simples" tarefa de achar uma flor.

## **Objetivos Gerais**

Os parâmetros determinantes do comportamento forrageador de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), foram avaliados através de protocolos experimentais de etologia cognitiva, que salientam a riqueza e a complexa plasticidade comportamental adaptativa das abelhas sociais. As metodologias e a discussão dos resultados propõem uma perspectiva evolutiva sobre a exploração eficiente das fontes alimentares.

O objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos comportamentais e neurológicos envolvidos na "simples" tarefa que uma abelha sem ferrão tem para encontrar uma flor.

### **Capítulo 1: Aprendizagem e Memória em *Melipona scutellaris* (Condicionamento Clássico Olfatório)**

**Objetivo:** Verificar a capacidade cognitiva das abelhas através do condicionamento clássico olfatório como influência que determina a tomada de decisão das forrageadoras.

### **Capítulo 2: Aprendizagem Contextual em *Melipona scutellaris***

**Objetivo:** Testar a habilidade das forrageadoras contextualizarem seus sinais químicos como sinais atraentes ou repelentes em fontes de alimento artificiais.

### **Capítulo 3: Estudo Neuro-anatômico do Lobo Antenal de *Melipona scutellaris*:**

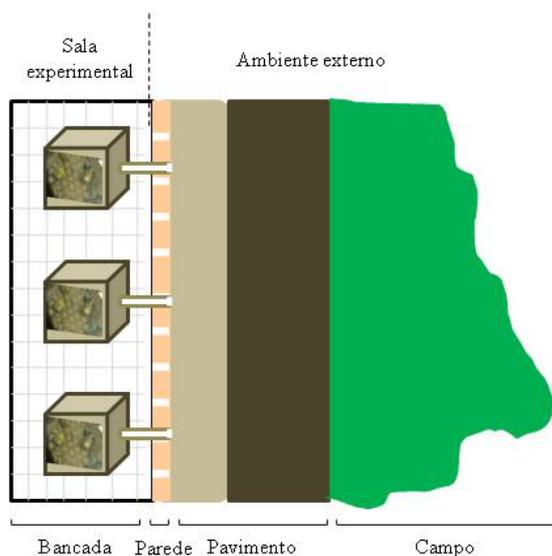
#### **Possível Significância na Percepção de Feromônios.**

**Objetivo:** Descrição neuro-anatômica do lobo antenal (centro primário olfatório) de *Melipona scutellaris*, e a possibilidade de haver uma estrutura especializada na detecção e processamento de informação feromonal, relacionada a comportamentos específicos: forrageamento e defesa do ninho.

## Material e Métodos Gerais

Dez colônias de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) estiveram disponíveis ao longo dos 4 anos de desenvolvimento desta tese (Outubro/2005 – Outubro/2009). Provenientes do Jardim do Seridó (Rio Grande do Norte) e de Aracajú (Sergipe) foram mantidas em caixas de madeira com tampa de vidro para as observações, dentro de uma sala experimental no Laboratório de Ecologia e Zoologia de Invertebrados, no Departamento de Biologia do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

As abelhas campeiras tinham livre acesso ao ambiente externo por meio de um tubo plástico que conectava a caixa que abrigava os ninhos, atravessava a parede, e permitia a saída das abelhas por um orifício (Figura 1).

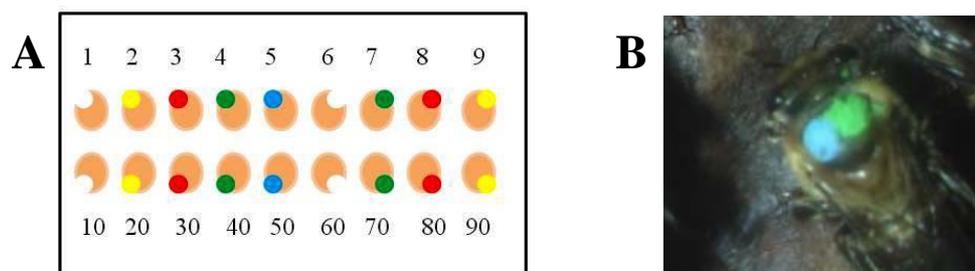


**Figura 1.** Representação esquemática do livre acesso das abelhas ao ambiente externo. Laboratório de Ecologia e Zoologia de Invertebrados, no Departamento de Biologia do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Para favorecer a manutenção das colônias, os ninhos receberam suplemento alimentar: solução de água e sacarose de cana de açúcar a 50% e, massa de pólen multi-floral.

As colônias utilizadas nos experimentos contavam com a presença de rainha fisogástrica executando as posturas, estoque de alimento nos potes e constância na atividade de forrageamento.

Nos experimentos descritos nos capítulos 1 e 2 as abelhas receberam marcas individuais de identificação no tórax feitas com tinta plástica (Acrilex Brasil<sup>®</sup>), como no modelo de identificação ilustrado na Figura 2 A e B. E, para a realização do estudo neuro-anatômico algumas amostras de abelhas forrageadoras foram coletadas, fixadas e enviadas à Université Paul Sabatier – Toulouse III em Toulouse, França (descrição completa no capítulo 3).



**Figura 2.** (A) Modelo de identificação das abelhas. Os círculos rosa representam o tórax das abelhas no eixo de orientação rostro-caudal. Os círculos menores em cores variadas correspondem à numeração que identifica as abelhas individualmente, por exemplo, (B) a abelha de número 57 recebeu uma marca azul do lado esquerdo superior (representa o número 50) e uma verde no superior direito (representa o número 7). As marcas são feitas com tinta plástica e palito de dente sobre o tórax das abelhas.

### *Melipona scutellaris*

Dentre as mais de 400 espécies de abelhas sem ferrão distribuídas pelas zonas tropicais e neotropicais, está *Melipona scutellaris*. Popularmente chamada de urucu nordestina, é considerada a expoente máxima das abelhas indígenas sem ferrão por sua produtividade e população com centenas de indivíduos, entre 400 – 600 indivíduos (Lindauer & Kerr, 1960). Naturalmente, seu ninho é encontrado em ocos de árvores altas (Kerr *et al.*, 1996) em regiões úmidas, na faixa litorânea do Nordeste. É uma abelha robusta capaz de forragear, efetivamente, num raio de cerca de 2 km ao redor do ninho (Roubik & Aluja, 1983; VanNieuwstadt & Iraheta, 1996; Araújo *et al.*, 2004). Assim como outras abelhas da tribo Meliponini são visitantes freqüentes e abundantes em copas de árvores, exercendo papel importante na regeneração de florestas tropicais (Ramalho *et al.*, 1989; 2004; Imperatriz-Fonseca, 1998). Outra característica relevante do gênero *Melipona* como agentes polinizadores é a estratégia eficiente de coleta de pólen através da vibração das anteras (Buzz pollination) de plantas com anteras poricidas (*e.g.* Solanacea) (Michener, 1962, 2000; Wille, 1963; Buchmann *et al.*, 1977; Bezerra & Machado, 2003). Para a manutenção de suas colônias populosas e perenes, precisam explorar um amplo espectro de fontes florais durante todo o ano (Michener, 1979).

## **Tabela de Vida (Descrição Metodológica no Anexo I)**

**Roselino AC, Hrcir M, Zucchi R. 2006. Tabela de vida e divisão de trabalho de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). XXIV Encontro Anual de Etologia - Brasília, DF. p. 127.**

O desenvolvimento comportamental de *Melipona scutellaris* está diretamente associado à idade dos indivíduos e suas capacidades de flexibilizar ações correspondentes às necessidades da colônia, gerando em cada indivíduo a ‘percepção’ de onde, e o que deve fazer para a manutenção da colônia. Através de observações da composição etária de uma colônia de abelhas sem ferrão podemos levantar dados relevantes sobre a ontogenia dos indivíduos que a compõem, a idade que iniciam cada atividade. No caso da atividade de forragear, saber a idade do indivíduo ou a média de idade do grupo que realiza a tarefa é de grande importância para avaliarmos em que condição do desenvolvimento os indivíduos entram em contato com os estímulos exteriores de forma direta e quando se expõem aos riscos existentes fora do ninho.

Na Tabela 1 podemos identificar que o índice de mortalidade de *Melipona scutellaris* foi maior no intervalo de 70 – 75 dias, quando as operárias já realizavam a tarefa de forragear. A expectativa média de vida das operárias neste intervalo foi de 8,6%, ou seja,  $\pm 5$  dias, se compararmos com a expectativa do início da atividade, no intervalo de 20 – 25 dias, a expectativa média de vida das operárias correspondia a 50%, ou seja,  $\pm 35$  dias.

**Tabela 1.** Tabela de vida de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).

Intervalo de Idade (x = 5 dias)	$l_x$	$d_x$	$q_x$	$e_x$
0 – 5	109	0	0	70,01
5 – 10	109	0	0	65,01
10 – 15	109	0	0	60,01
15 – 20	109	0	0	55,01
20 – 25	109	1	0,91	50,05
25 – 30	108	1	0,95	45,40
30 – 35	107	3	2,80	40,87
35 – 40	104	1	0,96	37,0
40 – 45	103	4	3,88	32,34
45 – 50	99	0	0	28,62
50 – 55	99	9	9,09	23,62
55 – 60	90	3	3,33	20,65
60 – 65	87	8	9,19	16,31
65 – 70	79	8	10,12	12,55
70 – 75	71	27	38,02	8,63
75 – 80	44	6	13,63	7,56
80 – 85	38	19	50,0	3,65
85 – 90	19	19	100,0	0,94

Legenda:  $l_x$  – número de indivíduos vivos em cada intervalo de idade;  $d_x$  – número de indivíduos mortos em cada intervalo de idade;  $q_x$  – proporção de indivíduos mortos em cada intervalo de idade;  $e_x$  – expectativa média de vida em cada intervalo de idade. Abaixo da linha tracejada corresponde ao período da atividade de forrageamento.

A média de vida de *M. scutellaris* foi  $70,02 \pm 14,97$  dias. Se compararmos com a média de encontrada para outras abelhas, há uma grande variação: *Plebeia (Friesella) schrottkyi* Friese: 30,1 dias (Camillo-Atique, 1977), *Frieseomelitta languida*: 33,3 dias (Ribeiro, 1989), *Melipona bicolor bicolor*: 44,0 dias (Bego, 1983), *Scaptotrigona postica* em 3 colônias: 26,3; 39,5 e 32,9 dias (Simões & Bego, 1991), *Melipona favosa*: 40,0 dias (Sommeijer, 1984). Giannini (1997) sugere tal variação é devida às condições internas da colônia, as diferentes épocas em que as observações foram feitas e as condições morfológicas e fisiológicas das operárias das diferentes espécies. Grosso & Bego (2002) encontraram a média de vida de *Tetragonisca angustula angustula* de  $20,9 \pm 11$  dias, para

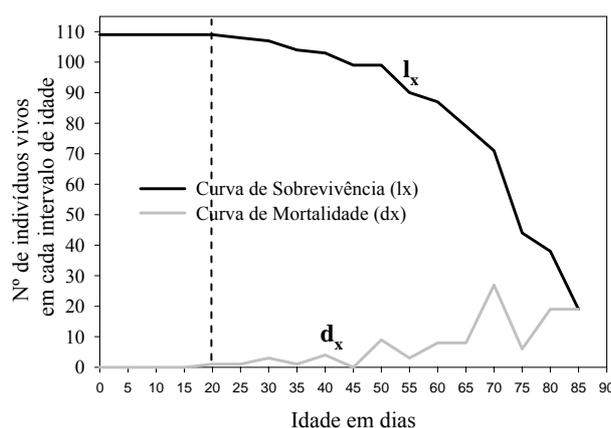
estas autoras a variabilidade na média de vida se deve ao fato de que o dinamismo e flexibilidade das atividades desenvolvidas está diretamente relacionada a atividade de forrageamento, idade que ocorre maior mortalidade das operárias, além das condições da colônia (forte ou fraca) e da sazonalidade.

Considerando que a expectativa de vida de uma abelha é uma característica importante em seu histórico, particularmente, porque existe uma conexão entre sua estratégia de forrageamento e o *fitness* de seu tempo de vida. Energeticamente, espera-se um decréscimo na probabilidade de sobrevivência futura como resultado do aumento de esforço despendido em atividades atuais, sendo então uma relevante força seletiva para a evolução de seu histórico de vida característico (Schmid-Hempel & Wolf, 1988). No exemplo estudado (Tabela 1) observamos que as operárias de *Melipona scutellaris*, despenderam a mais do que a metade de seu *lifespan* na atividade de forragear.

O balanço custo-benefício da atividade de forragear considera aspectos da economia colonial como o seu tamanho *versus* a população de campeiras, e também a morfologia funcional e comportamental das campeiras. Estas características suportam indiretamente à premissa de suas preferências florais (Ramalho *et al.*, 2007). A conjunção de variáveis como as restrições econômicas do forrageio com ponto central fixo e a troca eficiente de informações sobre as fontes florais no interior das colônias deve ser condição *sine qua non* para que a seletividade seja expressa de maneira ativa no nível colonial (Ramalho *et al.*, 2007). A redução sazonal na oferta das floradas surge como mais um dos fatores ambientais, especialmente nos ambientes tropicais úmidos e com alta diversidade de flores, como a Mata Atlântica, que influenciam as decisões econômicas do forrageamento, e que podem levar as campeiras a exibirem constância floral ou especialização temporária. A fidelidade floral é um comportamento frequentemente observado em *M. scutellaris* (Silva & Schindwein, 2003). As decisões individuais durante

o forrageio aliadas à dinâmica de processamento central de informações nas colônias têm sido usadas para explicar respostas rápidas às variações na qualidade relativa das fontes florais, com a concentração da força de trabalho colonial em floradas mais produtivas (Seeley, 1995, Hrncir, 2009).

A partir da Tabela de Vida (Tabela 1) conseguimos traçar as Curvas de Sobrevivência ( $l_x$ ) e Mortalidade ( $d_x$ ) (Figura 3). Observamos que as curvas se enquadram nas curvas características das abelhas melíferas e sem ferrão (Terada *et al.*, 1975; Simões & Bego, 1991; Inoue *et al.*, 1996), e estão diretamente relacionadas com a divisão de trabalho da espécie, principalmente com o início da atividade de forrageamento (Figura 3). A curva  $l_x$  representa a baixa mortalidade durante a fase inicial da vida, período de trabalho intranidal e, a alta mortalidade quando os indivíduos desempenham atividades fora do ninho. A curva  $d_x$  representa claramente que a partir de 20-25 dias de idade as taxas de mortalidade começam a aumentar, diminuindo o índice de sobrevivência do grupo das abelhas marcadas para a observação.



**Figura 3.** Curva de Sobrevivência ( $l_x$ ) e Curva de Mortalidade ( $d_x$ ) para *Melipona scutellaris*.  $l_x$  – número de indivíduos vivos em cada intervalo de idade;  $d_x$  – número de indivíduos mortos em cada intervalo de idade. A direita da linha tracejada corresponde ao período da atividade de forrageamento.

## Capítulo 1

### Aprendizagem e Memória em *Melipona scutellaris* (Condicionamento Clássico Olfatório)

#### 1.1. Introdução

Os insetos sociais (formigas, cupins, algumas vespas e algumas abelhas) são excelentes objetos de estudos neuro-etológicos do ponto de vista teórico, evolutivo e ecológico. As adaptações dos indivíduos para forragear, defender seu ninho, orientar-se espaço-temporalmente, e seu alto nível de organização social, estão evolutivamente relacionadas à sua habilidade de aprender rapidamente e com sua capacidade de formar memória de longa duração (Hammer & Menzel, 1995; Collett & Collett, 2002).

Em 1962, o Nobelistas Karl von Frisch afirmou: “O cérebro de um inseto tem o tamanho de uma semente de grama e não foi feito para pensar”. Depois de quatro décadas e importantes avanços nas pesquisas sobre cognição animal, esta afirmação foi refeita pelo pesquisador Martin Giurfa (2005), que disse: “O mini cérebro da abelha, certamente, não foi feito para pensar, pelo menos, não no sentido que entendemos hoje por pensar, mas possui ferramentas úteis para o seu desenvolvimento”.

O inesgotável repertório comportamental das abelhas é controlado por um pequenino cérebro de  $1\text{mm}^3$ , composto por menos de  $10^6$  neurônios. O processo de evolução foi extraordinariamente econômico e efetivo sobre os mecanismos que controlam a variedade de comportamentos que estes insetos desenvolveram. A pressão de seleção da cadeia alimentar sobre a evolução de estruturas corporais, comportamento instintivo e mecanismos de aprendizagem é discutido em termos de interação corpo-cérebro, predador-presa, memória de veneno, de dor, de prazer/satisfação. As soluções fisiológicas e

comportamentais são usadas para resolver os problemas de sobrevivência (Garcia & Garcia y Robertson, 1984). Sabemos que a integração de diversas informações determina o comportamento de tomada de decisão sobre quando, onde e o quê forragear (Biesmeijer & Slaa, 2004). Uma abelha toma decisões comportamentais baseadas em informações de fontes variadas, dentre elas: auto-informação (preferências espontâneas e memória), ambiente do ninho (estado da colônia e dos outros indivíduos da colônia), condições climáticas, características das flores, e outras fontes de alimento, ou a presença ou ausência de predadores. As abelhas sem ferrão demonstram preferências espontâneas por alguns parâmetros para forragear, entre eles, a cor e o odor das flores (Pessotti & Lé Sénéchal, 1981; Bonod *et al.*, 2003; Biesmeijer & Slaa, 2004; Daly *et al.*, 2004; Cook *et al.*, 2005).

A atividade de forrageamento é baseada no processo de condicionamento associativo, no qual as abelhas associam uma ou mais informações provenientes do ambiente e da fonte de alimento para a coleta de recursos. Entre os estímulos que encontram nas flores, os odores florais associados ao alimento (néctar) é comprovadamente, o mais eficiente para o reconhecimento das fontes florais (Laloi *et al.*, 1999 b; Bonod *et al.*, 2003). Adicionalmente, os efeitos de fatores intrínsecos parecem contribuir para determinar a constância floral, via aprendizagem e memória. O aprendizado e a memória são cruciais para estabelecer e armazenar relações entre estímulos, que são fundamentais para originar o comportamento adaptativo (Gerber *et al.*, 1996).

O aprendizado associativo é uma capacidade amplamente distribuída entre os animais, que consiste em estabelecer uma relação contingente entre eventos no ambiente, para a adaptação do comportamento, através de experiências individuais relacionadas a tais eventos (*decision making*) (Giurfa, 2003; 2007). As principais formas de aprendizado associativo conhecidas são o Condicionamento Clássico (Pavlov, 1927) - habilidade dos animais aprenderem a associar um estímulo neutro (estímulo condicionado - CS) com um

estímulo biologicamente relevante (estímulo incondicionado - US) e o Condicionamento Operante (Skinner, 1938) – habilidade em associar o próprio comportamento com um reforço (Giurfa, 2007). Desde experimentos de Forel (1910) e Frisch (1914) *apud* Breed *et al.* (1982), técnicas de condicionamento têm obtido sucesso nos estudos sobre fisiologia sensorial. A capacidade de aprendizagem em abelhas melíferas tem sido amplamente estudada para verificar as respostas comportamentais e fisiológicas que são geradas através do processo de aprendizado (Laloi *et al.*, 1999 b; Sandoz *et al.*, 2000; Bonod *et al.*, 2003).

Quando a antena de uma abelha (*Apis mellifera*) faminta recebe uma informação de odor, e em seqüência, é oferecido a ela solução de sacarose, o animal, através de um reflexo inato, responde estendendo sua probóscide para ingerir a sacarose. Depois de repetidas apresentações, odor-sacarose, através de uma associação temporal, a abelha passa a relacionar o odor ao alimento. O odor na antena, geralmente, não exerceria a mesma reação em abelhas que não foram expostas à estimulação odor-sacarose.

O Condicionamento Clássico (Pavlov, 1927) permite um bom controle dos vetores do condicionamento e de variáveis fisiológicas. Nesta operação de condicionamento os animais aprendem que uma dada resposta é seguida pela ocorrência ou supressão de um reforço (Giurfa & Malun, 2004). Tal comportamento é claramente descrito como aprendizado associativo (Hammer & Menzel, 1998; Laloi *et al.*, 2001; Sandoz & Pham-Delègue, 2004).

Como pré-requisito, o aprendizado deve deixar mudanças estruturais e funcionais no cérebro. A progressão de diferentes fases de excitação das estruturas sensoriais é uma característica da formação da memória (Farber *et al.*, 1999). Há evidências, de que invertebrados e mamíferos apresentam distintos mecanismos moleculares que contribuem para o processo multifásico de formação da memória, mas pouco se sabe sobre a bioquímica que permeia a indução e a manutenção das diferentes fases da memória e, quais

são os sinais que contribuem para os distintos aspectos do aprendizado (Müller, 2002). Os sinais que geram a ativação nervosa, e que desencadeiam uma série de reações químicas no cérebro das abelhas, levam a determinados comportamentos relacionados à expressão de aprendizado e memória (Hildebrandt & Müller, 1995; Müller, 1997).

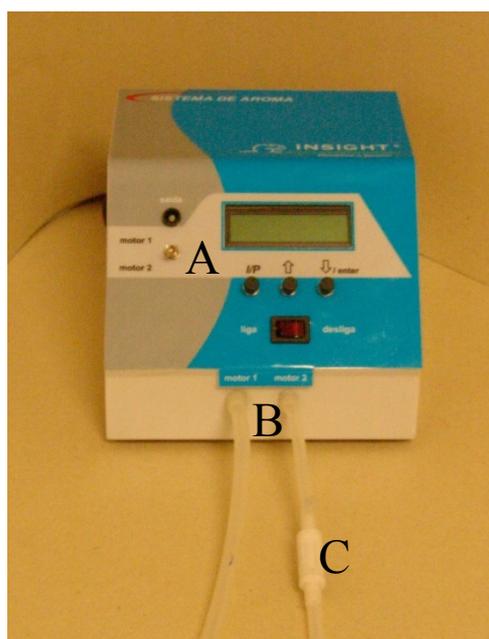
Trabalhos sobre como as abelhas melíferas aprendem a detectar e discriminar fontes de alimentos através de informações de odor sugere que estes organismos são capazes de aprender um odor ou uma composição de odores e associá-los ao recurso alimentar de forma condicionada, registrando em sua memória onde buscar comida (Slaa *et al.*, 2003). Podem também identificar odores específicos em compostos voláteis, percebendo variações na concentração do estímulo, no comprimento e a forma da cadeia de carbono que o compõe e até mesmo a mudança no grupo funcional que distingue uma substância em um dado composto (Hosler & Smith, 2000; Wright & Smith, 2004). As abelhas não só respondem ao aprendizado de estímulo em concentrações, direções e distâncias diferentes (Jarau *et al.* 2000), mas se sensibilizam também pela quantidade de vezes em que é exposta a tal estímulo (Müller *et al.*, 2000; Pankiw *et al.*, 2003). A resposta ao aprendizado, reflexo de extensão da probóscide, varia em épocas diferentes. Scheiner *et al.*, (2004) sugere que esta variação pode ser em função do genótipo, idade do indivíduo, sua casta, seu desempenho para o aprendizado olfativo e as condições ambientais (veja também: Bhagavan *et al.*, 1994; Pankiw & Page, 1999; Laloï *et al.*, 1999 a; 2001, Pankiw *et al.*, 2003).

Considerando o que foi exposto, é ecologicamente relevante o teste de etologia cognitiva de insetos em laboratório, para revelar a variação das habilidades de aprendizado e memória. Contudo, este capítulo tem o objetivo de verificar se as operárias forrageadoras de uma espécie de abelha sem ferrão, *Melipona scutellaris*, após terem sido condicionadas a um estímulo de odor, são capazes de demonstrar o aprendizado e se utilizam tal informação para a Tomada de Decisão durante teste de escolha por uma fonte de alimento.

## 1.2. Material e Métodos

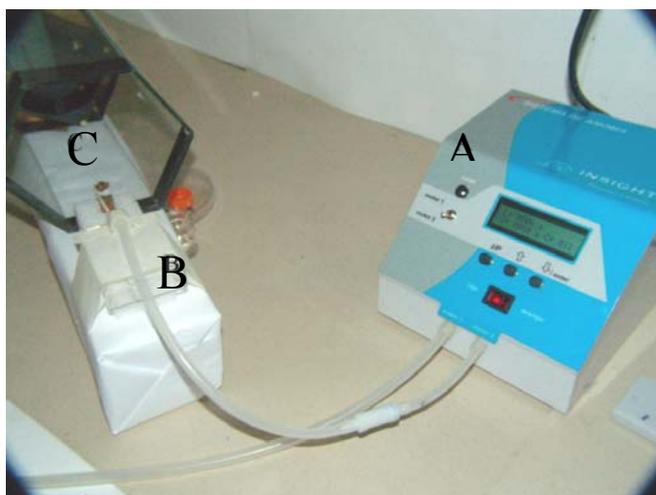
### 1.2.1. Equipamentos

**1.2.1.1. Liberador de odores (Insight<sup>®</sup>):** equipamento eletrônico que opera liberando um fluxo de ar inodoro ou com odor. Este equipamento tem um cronômetro ajustável com display digital, 2 bombas de ar (Big Air A420<sup>®</sup>) e 2 ductos de passagem de ar. Através de um deles, o fluxo de ar é liberado sem a presença de cheiro e, através do outro, libera ar com odor. Neste ducto há um compartimento antes da saída do ar, onde se coloca um papel filtro com a solução de odor (Figura 1.1).



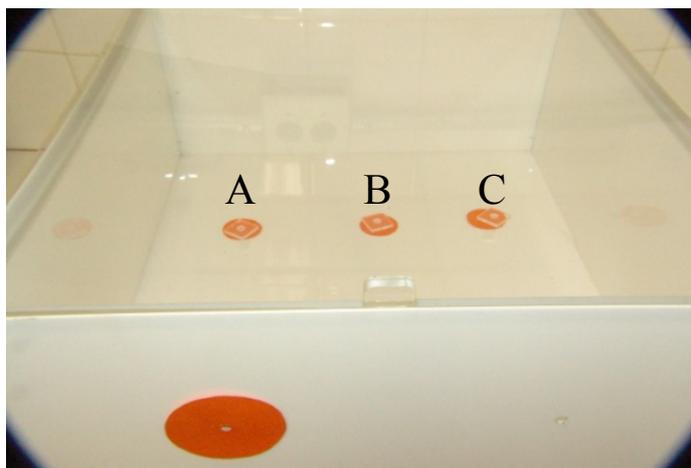
**Figura 1.1.** Liberador de odores (Insight<sup>®</sup>). Equipamento que libera o fluxo de ar utilizado como carreador de odor durante o condicionamento clássico olfatório. (A) Cronômetro ajustável, com display digital; (B) 2 bombas de ar (internas) (Big Air A420<sup>®</sup>) e 2 ductos de passagem de ar; (C) compartimento onde se coloca um papel filtro com a solução de odor.

**1.2.1.2** Exaustor: construído a partir de um aquário de vidro, um *cooler* de computador (8 cm de diâmetro) e tubos de PVC<sup>®</sup>. Instalado do lado oposto ao fluxo de ar (Figura 1.2 C), serviu para que o ambiente experimental não ficasse saturado pelo odor empregado durante o condicionamento. Através do *cooler* o ar é sugado e direcionado para o ambiente externo à sala de experimento pela tubulação da PVC<sup>®</sup>.



**Figura 1.2.** Ambiente experimental (*setup*) composto por (A) Liberador de odor, com os ductos de saída de ar e compartimento para filtro com odor, (B) base para posicionar a abelha e, (C) exaustor para garantir a não saturação do ar.

**1.2.1.3.** Caixa de Teste (Insight<sup>®</sup>) para realização do Teste de Tomada de Decisão (Figura 1.3). Constituída por uma caixa de acrílico branco, com tampa de acrílico transparente. Dimensões: 60 cm de comprimento x 50 cm de largura x 25 cm de altura. Esta caixa teve como objetivo criar um ambiente relativamente complexo, onde uma abelha de cada vez, deveria escolher 1 entre 3 alimentadores (Figura 1.4), de acordo com a informação de odor que hipoteticamente será aprendida durante o condicionamento.



**Figura 1.3.** Caixa de Teste para realização do Teste de Tomada de Decisão. Caixa de acrílico branco, com tampa de acrílico transparente. Dimensões: 60 cm de comprimento x 50 cm de largura x 25 cm de altura. (A) Linalool e US = CS<sup>l</sup> +, (B) US e, (C) Geraniol e US = CS<sup>g</sup> +.

**1.2.1.4.** Alimentadores de acrílico usados dentro da Caixa de Teste para Teste de Tomada de Decisão. Dimensões: 3,0 x 3,0 x 0,5 cm<sup>3</sup>, sendo que o orifício central, onde se coloca a solução de sacarose, mede 0,5 cm de diâmetro e 0,3 cm profundidade (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Modelo de alimentador de acrílico usado dentro da Caixa de Teste para Teste de Tomada de Decisão. Dimensões: 3,0 x 3,0 x 0,5 cm<sup>3</sup>, com um orifício central, onde se coloca a solução de sacarose de 0,5 cm de diâmetro e 0,3 cm de profundidade.

**1.2.1.5.** Odores (Estímulo Condicionado - CS): Linalool (Lnl)  $\geq 95\%$  - Fluka<sup>®</sup> (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O), tratado por CS<sup>l</sup>. Geraniol (Grl) 98% - Aldrich<sup>®</sup> (C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O), tratado por CS<sup>g</sup>. Os odores foram utilizados em solução de álcool absoluto e o odor, na proporção de 2:1 (µl).

**1.2.1.6.** Papel filtro (3,0 x 1,0 cm).

**1.2.1.7.** Solução de água e sacarose 55% w/w (Estímulo Incondicionado – US): Sacarose (99,5% - C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> - Sigma<sup>®</sup>), tratado por +. Quando as abelhas forem estimuladas somente com o odor, ou seja, a ausência de reforço no condicionamento, a notação será o símbolo de menos (-).

## **1.2.2. Coleta e Preparação das Abelhas**

No período de maio a setembro de 2007, operárias forrageadoras foram coletadas com rede entomológica em frente a três colônias diferentes, durante vôo de saída para o campo. Cada uma das forrageadoras coletadas recebeu uma identificação (Figura 2). Sem receber qualquer tratamento para diminuição da atividade (resfriamento com gelo ou anestesia com CO<sub>2</sub>), foram contidas com fita adesiva em um suporte de metal, onde permaneceram por 1 hora em temperatura ambiente, sem receber alimento. As antenas e peças bucais podiam se movimentar livremente (Figura 1.5) (Shafir *et al.*, 1999). As abelhas contidas desta maneira foram usadas tanto no Pré-teste (1.2.3), quanto no Condicionamento Clássico Olfatório (1.2.6).



**Figura 1.5.** Operária de *Melipona scutellaris* contida em suporte de metal com fita adesiva. As antenas e peças bucais permanecem livres para realização de Condicionamento Clássico Olfatório através do Reflexo de Extensão da Probóscide (PER).

### 1.2.3. Pré-teste

O teste de Reflexo de Extensão da Probóscide a várias concentrações de sacarose foi realizado em 101 abelhas forrageadoras, para identificar a partir de qual concentração de sacarose as abelhas passam a responder com a mesma intensidade. Foram preparadas soluções de 5%, 15%, 25%, 35%, 45%, 55%, 65%. A oferta de sacarose foi feita em seqüência ascendente de concentração e, consistiu em tocar uma das antenas, ora a direita ora a esquerda, com um palito de dente embebido na solução. Para cada concentração foi utilizado um único palito, assim não houve risco de misturar as concentrações durante os testes. Água foi oferecida entre as apresentações das soluções de sacarose. A resposta de extensão da probóscide a água serviu como controle sobre o potencial efeito das repetidas estimulações de sacarose que poderiam levar a sensibilização ou habituação das respostas subseqüentes (Page *et al.*, 1998).

#### **1.2.4. Teste de Inclusão de Abelhas no Grupo Experimental - Reflexo de Extensão da Probóscide (PER)**

As abelhas devidamente preparadas (1.2.2) passaram pelo teste de Reflexo de Extensão da Probóscide para serem incluídas nos grupos experimentais: CS<sup>l</sup> +, CS<sup>g</sup> +, CS<sup>l</sup> -, CS<sup>g</sup> -. Os indivíduos deveriam responder estendendo a probóscide imediatamente ao toque na antena com um palito de madeira embebido em solução de sacarose 55%. As abelhas que não responderam a este teste foram descartadas. Não foi permitida a ingestão de sacarose.

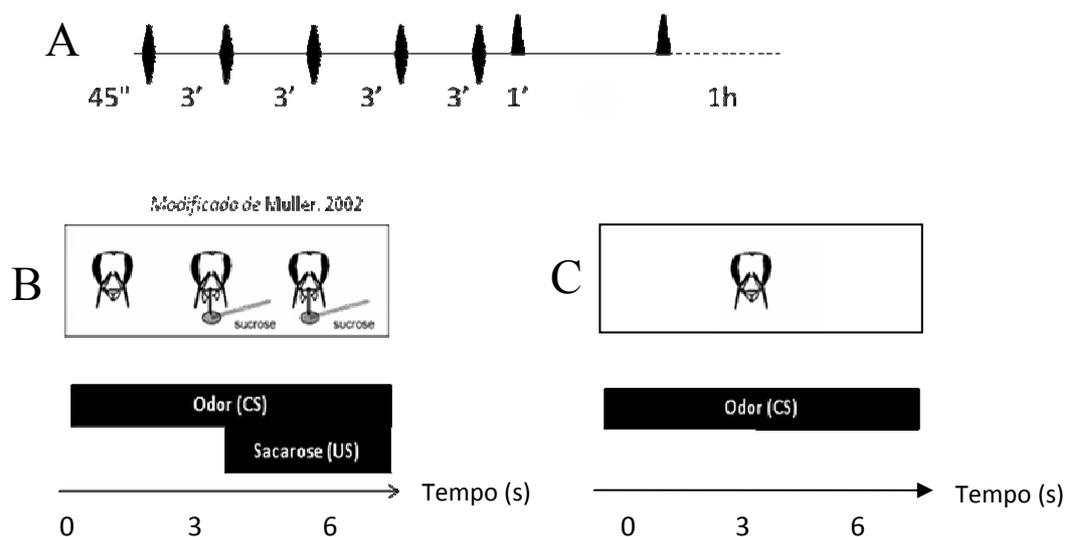
#### **1.2.5. Posicionamento das Abelhas no Ambiente Experimental**

Com o exaustor funcionando, uma abelha foi posicionada no *setup* com a saída do fluxo de ar a 4 cm de distância da cabeça, na altura das antenas. Um fluxo de ar inodoro era liberado por 45 segundos, para assegurar que as abelhas não seriam condicionadas pelo estímulo mecânico (ar). Imediatamente após o término do fluxo de ar inodoro iniciava a primeira trilha do condicionamento. As abelhas foram condicionadas uma a uma.

#### **1.2.6. Condicionamento Clássico Olfatório: Reflexo de Extensão da Probóscide – PER (CS+)**

Para cada abelha uma tira de papel filtro, colocada no compartimento de odor, foi embebida em 10 µl da solução de odor (Figura 1.1 C). Foram apresentadas 5 trilhas de CS (CS<sup>l</sup> ou CS<sup>g</sup>) seguido de US (+) para cada grupo referente ao tipo de odor, ou seja, 5 x CS<sup>l</sup> + para o grupo condicionado ao Linalool (N = 70) e, 5 x CS<sup>g</sup> + para o grupo condicionado ao Geraniol (N = 70). A Figura 1.6 descreve como se desenvolveu o procedimento experimental. A Figura 1.6 A indica a linha de tempo que ocorre o condicionamento

completo. Cada losango preto sobre a linha do tempo (Figura 1.6 A) se refere a uma trilha do condicionamento (Figura 1.6 B). Em cada uma das trilhas houve 6 segundos de exposição do fluxo de ar com odor. Os 3 segundos iniciais as abelhas eram expostas somente ao fluxo de ar com odor, e durante os 3 segundos finais somente a apresentação de US, através de um toque na antena com um palito de dente. Nestes mesmos 3 segundos, foi permitido as abelhas beber uma gota de US para consolidar a relação odor-reforço (CS+). Entre cada trilha havia um intervalo de 3 minutos.



**Figura 1.6.** Descrição do protocolo temporal do Condicionamento Clássico Olfatório. (A) indica a linha de tempo que ocorre o condicionamento completo. Cada losango preto sobre a linha do tempo indica uma trilha do condicionamento (B). Os triângulos sobre a linha se referem ao Teste de Memória de Curto Prazo em 1' e 6'(C).

### **1.2.7. Condicionamento Clássico Olfatório: Reflexo de Extensão da Probóscide – PER (CS-)**

O protocolo experimental descrito foi repetido na ausência de US (Figura 1.6 C), ou seja, a cada trilha de condicionamento as abelhas somente foram expostas ao estímulo condicionado por 6 segundos (CS<sup>l</sup>, N = 30 ou CS<sup>g</sup>, N = 30). Após a apresentação das trilhas, as abelhas foram submetidas ao Teste de Memória à Curto Prazo (1.2.8) e ao Teste de Escolha do Alimentador (1.2.9).

### **1.2.8. Teste de Memória de Curto Prazo**

Com o objetivo de verificar o estabelecimento de Memória de Curto Prazo (relação odor – alimento) foi realizado o Teste de Memória após 1 minuto e 6 minutos do término do condicionamento (Figura 1.6 A e C). Este teste consistiu na observação da resposta de extensão da probóscide para o estímulo condicionado, CS<sup>l</sup> para o grupo condicionado ao Linalool e CS<sup>g</sup> para o grupo condicionado ao Geraniol.

### **1.2.9. Teste de Escolha do Alimentador: Tomada de Decisão**

Uma hora depois do Teste de Memória de Curto Prazo, as abelhas foram retiradas dos suportes de metal e introduzidas, uma a uma, na Caixa de Teste (Figura 1.6 D), onde havia três alimentadores dispostos do lado oposto ao orifício de entrada das abelhas (Figura 1.3). (A) o 1º alimentador (à esquerda do observador) continha 5µl de US e papel filtro embebido em 10 µl de solução (CS<sup>l</sup>), (B) o 2º alimentador (entre o 1º e o 3º) continha 5 µl de US e, (C) o 3º alimentador (à direita do observador), 5 µl de US e papel filtro embebido em 10 µl de solução (CS<sup>g</sup>). Neste teste a abelha deveria se dirigir ao alimentador que

apresentava o odor correspondente ao usado no condicionamento. Foi registrada apenas a primeira escolha.

#### **1.2.10. Grupo Controle**

Um grupo composto por 65 abelhas coletadas com rede entomológica em frente à saída das colônias, e mantidas 1 hora sem alimento, dentro de placas de Petri. Foram introduzidas, uma a uma, na Caixa de Teste (Figura 1.3), como no Teste de Escolha do Alimentador - Tomada de Decisão (1.2.9). Estas abelhas deveriam escolher espontaneamente 1 entre 3 alimentadores com estímulos diferentes, sem terem passado pelo Condicionamento Clássico Olfatório (abelhas inexperientes). No alimentador (A) havia filtro embebido em solução CS<sup>l</sup> e US, no alimentador (B) havia somente US e, no alimentador (C), filtro embebido em CS<sup>g</sup> e US.

#### **1.2.11. Análise Estatística**

##### **1.2.11.1. Teste de Escolha do Alimentador**

Comparação entre as proporções das escolhas das abelhas entre 3 alimentadores para cada um dos grupos: *Qui-quadrado*,  $P < 0,05$ .

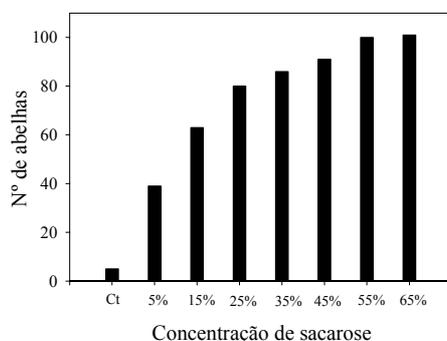
##### **1.2.11.2. Grupo Controle**

Comparação entre as proporções das escolhas espontâneas entre os 3 alimentadores: *Qui-quadrado*,  $P < 0,05$ .

### 1.3. Resultados

#### 1.3.1. Pré-teste

A figura 1.7 indica que a partir da solução 55% de sacarose, 100% das abelhas (N = 101) responderam a solução de sacarose através do Reflexo de Extensão da Probóscide. A partir deste resultado determinamos para este trabalho que durante o Condicionamento Clássico Olfatório de *Melipona scutellaris* seria utilizado solução de sacarose a 55%.



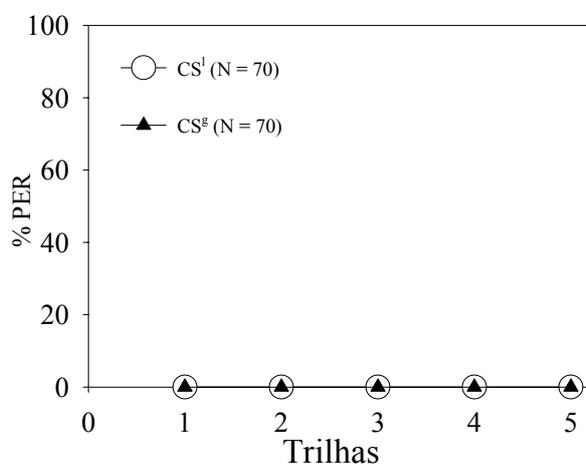
**Figura 1.7.** Reflexo de Extensão da Probóscide a diferentes concentrações de solução de sacarose (5%, 15%, 25%, 35%, 45%, 55%, 65%). O controle (Ct) foi realizado com a apresentação de água entre as apresentações de sacarose. (N = 101).

#### 1.3.2. Teste de Inclusão de Abelhas no Grupo Experimental

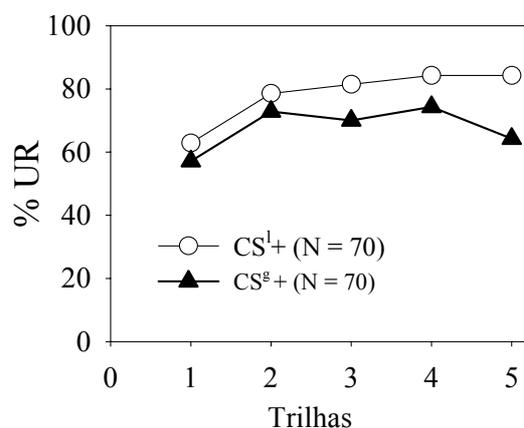
No máximo 8% das abelhas de cada grupo não responderam adequadamente. Portanto,  $\pm 6$  abelhas em cada grupo. Cada grupo foi designado por  $CS^l +$  (N = 70),  $CS^g +$  (N = 70),  $Gc$  (N = 65),  $CS^l -$  (N = 30),  $CS^g -$  (N = 30).

### 1.3.3. Condicionamento Clássico Olfatório (CS+)

Nenhuma abelha demonstrou aquisição durante a fase de condicionamento como o esperado (Figura 1.8), ou seja, nenhuma abelha foi capaz de estender a probóscide durante os 3 primeiros segundos de exposição ao odor (CS<sup>l</sup>, N = 70 e CS<sup>g</sup>, N = 70). A Figura 1.9 representa a porcentagem das abelhas que responderam ao estímulo incondicionado (+), nos 3 segundos finais da apresentação do odor (CS<sup>l</sup>+ e CS<sup>g</sup>+).



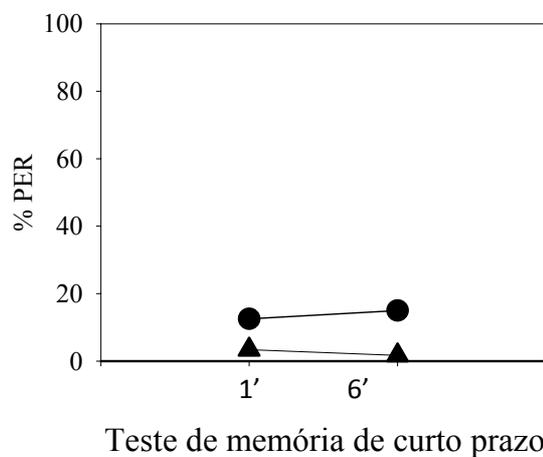
**Figura 1.8.** Condicionamento Clássico Olfatório. Porcentagem de respostas à CS durante os 3 primeiros segundos da apresentação de odor durante cada trilha do condicionamento (%PER). Nenhuma abelha demonstrou aquisição para os dois odores. Linalool - CS<sup>l</sup> (círculo vazado, N = 70) e Geraniol - CS<sup>g</sup> (triângulo preenchido, N = 70).



**Figura 1.9.** Condicionamento Clássico Olfatório. Porcentagem de abelhas que responderam à solução de sacarose nos 3 segundos finais da apresentação do estímulo de odor (%UR). Linalool - CS<sup>L</sup>+ (círculo vazado, N = 70) e Geraniol - CS<sup>G</sup>+ (triângulo preenchido, N = 70).

#### 1.3.4. Teste de Memória de Curto Prazo (CS+)

Mesmo que as abelhas não tenham demonstrado aquisição, o método descrito na seção anterior foi realizado integralmente. Sendo assim, após 1 e 6 minutos do final das 5 trilhas de condicionamento, as abelhas passaram por um teste para verificar se havia sido formada memória de curto prazo. Durante a liberação de odor não pareado ao reforço (CS<sup>L</sup>, CS<sup>G</sup>) menos de 20% das abelhas responderam com a extensão da probóscide em direção ao odor (Figura 1.10). Ressalta-se que a maior porcentagem de resposta foi para o estímulo Linalool.



**Figura 1.10.** Teste de Memória de Curto Prazo. Porcentagem de abelhas que responderam com o reflexo de extensão da probóscide para o estímulo de odor. Linalool - CS<sup>l</sup> + (círculo, N = 70) e Geraniol - CS<sup>g</sup> + (triângulo, N = 70).

### 1.3.5. Teste de Escolha do Alimentador (Tomada de Decisão) (CS+)

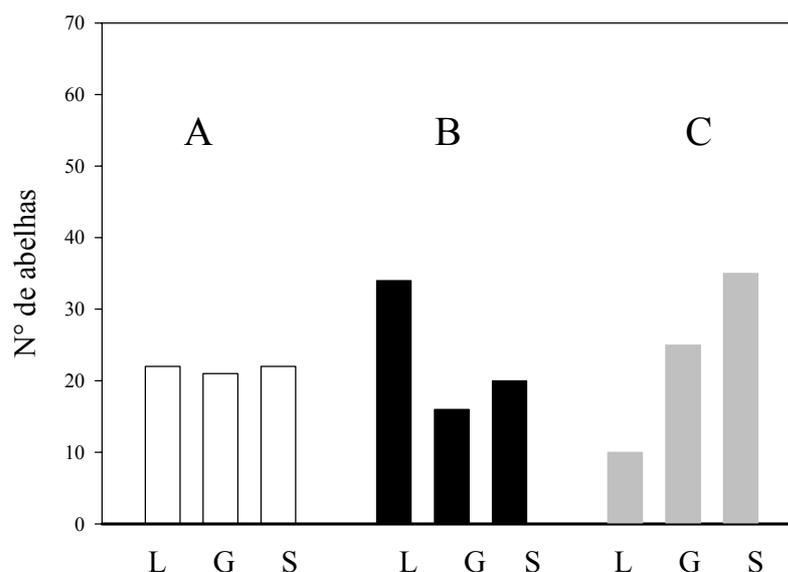
#### 1.3.5.1. Tomada de Decisão: Grupo Controle

A Figura 1.11 A. ilustra que as abelhas inexperientes (Grupo controle, N = 65) frente aos 3 alimentadores não fizeram distinção entre os diferentes estímulos, *Qui-quadrado*:  $X^2 = 0,03$  ( $P > 0,05$ ). O resultado demonstra que nenhum dos estímulos foi preponderante sobre os demais, sugerindo que o condicionamento olfatório, se efetivo, poderá dirigir a tomada de decisão sobre qual alimentador em particular as abelhas coletarão o recurso alimentar.

### 1.3.5.2. Tomada de Decisão: Grupo de abelhas condicionadas

Uma hora depois do último teste de memória de curto prazo (6'), as abelhas foram introduzidas na caixa de teste, uma a uma, para escolherem 1 entre 3 alimentadores disponíveis. O resultado indica que as abelhas não escolheram por um dos alimentadores aleatoriamente.

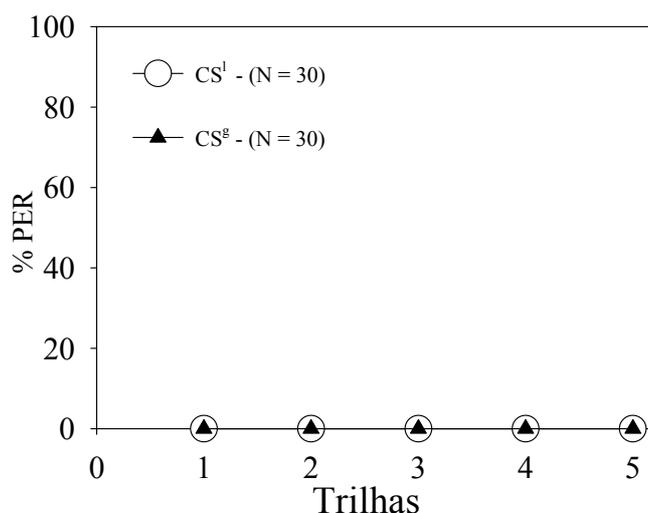
A Figura 1.11 B. retrata que as abelhas se dirigiram para o alimentador que continha o papel filtro embebido na solução de Linalool, a mesma exposta no condicionamento. Quando comparamos os grupos, encontramos diferença, *Qui-quadrado*:  $X^2 = 7,65$  ( $P < 0,05$ ). No grupo de abelhas que foram condicionadas com Geraniol (Figura 1.13 C), também encontramos diferença entre os grupos, *Qui-quadrado*:  $X^2 = 13,57$  ( $P < 0,05$ ). No primeiro caso (Figura 1.11 B) nota-se a tendência maior na escolha pelo alimentador que apresentava o Linalool. No segundo caso (Figura 1.11 C), a diferença apresentada pelas barras cinza não é acentuada, mas em relação ao Linalool, podemos ver com clareza que este alimentador foi o menos visitado. Em ambos os condicionamentos, o odor não exposto no condicionamento recebeu a menor porcentagem de escolha, 22,8% Geraniol (Figura 1.11 B) e 14,2% Linalool (Figura 1.11 C).



**Figura 1.11.** Teste de Escolha do Alimentador (Tomada de Decisão). (A) Grupo controle (N = 65): escolha espontânea de abelhas forrageadoras inexperientes por 1 entre 3 alimentadores disponíveis na caixa de teste. (B) Grupo condicionado por Linalool (N = 70):  $\approx 50\%$  das abelhas se dirigiram para o alimentador que continha papel filtro embebido em solução de Linalool (*Qui-quadrado*:  $X^2 = 7,65$  ( $P < 0,05$ )). (C) Grupo condicionado por Geraniol (N = 70):  $50\%$  das abelhas se dirigiram para o alimentador que continha papel filtro embebido em solução de Geraniol (*Qui-quadrado*:  $X^2 = 13,57$  ( $P < 0,05$ )). L = Linalool, G = Geraniol, S = Sacarose.

### 1.3.6. Condicionamento Clássico Olfatório (CS-)

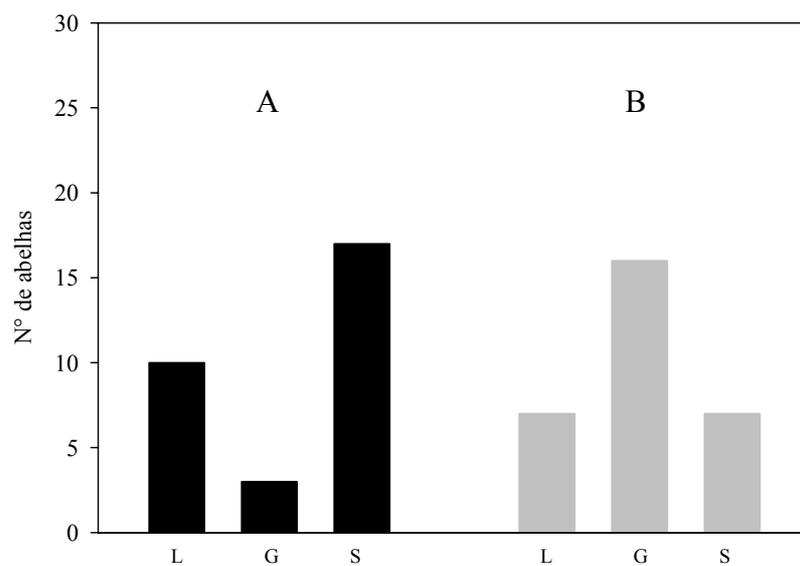
Nenhuma abelha (CS<sup>l</sup> -, N = 30; CS<sup>g</sup> -, N = 30) que passou pelo condicionamento CS- respondeu com a extensão da probóscide ao estímulo condicionado a que foi exposta por 6 segundos (Figura 1.12). Durante o teste de memória de curto prazo o mesmo resultado se repetiu. Neste procedimento a falta de US (+) enfraqueceu as abelhas e algumas morreram antes do início do teste de tomada de decisão e, então foram descartadas das análises, por esta razão o tamanho da amostra no teste de tomada de decisão para o grupo CS- (N = 30) é menor que o grupo CS+ (N = 70).



**Figura 1.12.** Condicionamento Clássico Olfatório (CS-). Porcentagem de respostas à CS durante 6 segundos de apresentação de odor durante cada trilha do condicionamento (%PER). Nenhuma abelha reagiu com a extensão da probóscide para o Linalool CS<sup>l</sup> - (círculo vazio, N = 30) e para o Geraniol CS<sup>g</sup> - (triângulo preenchido, N = 30).

### 1.3.7. Teste de Escolha do Alimentador (Tomada de Decisão) (CS-)

Considerando a sensibilização pelo odor, assim como as abelhas que passaram pelo condicionamento e receberam o reforço (+), as abelhas que somente receberam o estímulo condicionado (CS) também poderiam utilizar a informação de odor para dirigir suas escolhas pelos alimentadores dentro da caixa de teste. As barras pretas na Figura 1.13 A. correspondem às escolhas feitas pelas abelhas que foram estimuladas por Linalool, *Qui-quadrado*:  $X^2 = 9,8$  ( $P < 0,05$ ), porém, a maior quantidade de abelhas optou pelo alimentador somente com sacarose. Para o grupo de abelhas que foram estimuladas por Geraniol as escolhas não foram diferentes, *Qui-quadrado*:  $X^2 = 5,4$  ( $P > 0,05$ ).



**Figura 1.13.** Teste de Escolha do Alimentador (Tomada de Decisão). Teste realizado com abelhas que passaram pelo condicionamento sem reforço, CS-. (A) Linalool (N = 30): *Qui-quadrado*,  $X^2 = 9,8$  ( $P < 0,05$ ). (B) Geraniol (N = 30):  $X^2 = 5,4$  ( $P > 0,05$ ). L = Linalool, G = Geraniol, S = Sacarose.

#### 1.4. Discussão

A avaliação da concentração de sacarose pelas forrageadoras conduz as decisões sobre a exploração de determinada fonte e o recrutamento de mais indivíduos para um local. O somatório das habilidades sobre a avaliação da concentração de sacarose altera os limiares de respostas individuais e interfere na alocação de forrageadoras entre diferentes fontes disponíveis e as decisões sobre a quantidade de ingestão que será realizada (Scheiner *et al.*, 2004). O limiar de resposta de um indivíduo pode ser mensurado através do reflexo de extensão da probóscide, considerando a menor concentração de sacarose que elícita o reflexo (Kunze, 1933; Marshall, 1935) ou a menor concentração de sacarose que uma abelha é capaz de distinguir a solução de sacarose da água (Page *et al.*, 1998). Para um grupo, o limiar de resposta deve ser estatisticamente significativo quando comparado à resposta do grupo à água. Então, a partir do limiar de resposta, o indivíduo ou o grupo geralmente passa a responder através da extensão da probóscide para todas as concentrações de sacarose mais altas (Page *et al.*, 1998). Considerando estas informações, o Pré-teste (1.3.1) foi realizado para identificar a concentração de sacarose que 100% dos indivíduos testados responderiam com a extensão da probóscide (Figura 1.7), assim garantimos que não seria a falta de motivação relacionada ao reforço, um viés fisiológico que afetaria negativamente o aprendizado das abelhas.

Durante a primeira fase da aprendizagem, a resposta das abelhas (PER) ao odor (CS) em cada trilha do condicionamento foi registrada, como uma medida contínua da aquisição (Hosler & Smith, 2000), que é a resposta comportamental ao estímulo que prediz o alimento/reforço. Nenhum grupo (CS<sup>l</sup> +, CS<sup>g</sup> +, CS<sup>l</sup> -, CS<sup>g</sup> -) demonstrou aquisição (Figura 1.8 e 1.12). Mas a quantificação da resposta (PER) a US também foi realizada e, então obtivemos curvas que se assemelham às curvas típicas de aprendizado (Figura 1.9).

Esse resultado é importante como controle da reação à presença do estímulo incondicionado (motivação), que está relacionada com a formação de diferentes fases da memória: curto, médio e longo prazo (Dacher *et al.*, 2005).

No teste de memória de curto prazo, algumas abelhas responderam principalmente para a exposição ao Linalool (Figura 1.10), o mais intrigante é o fato de que essas abelhas que responderam ao teste, responderam ou à primeira exposição (1 minuto) ou à segunda exposição (6 minutos) e, apenas 3 indivíduos responderam aos dois tempos de exposição do estímulo (Linalool). Possivelmente, o baixo índice de respostas durante o teste de memória de curto prazo é consequência da ausência de aquisição. Algumas hipóteses podem ser sugeridas para este resultado. Menzel *et al.* (2001) sugere: a aquisição de informação olfatória através do reflexo de extensão da probóscide é dependente de variáveis como o tipo de estímulo condicionado (odor), a intensidade do estímulo incondicionado (quantidade e concentração da solução de sacarose recebida durante o condicionamento), o número de trilhas e o intervalo entre elas. Esta última variável é considerada como fator dominante para a aquisição e retenção. Geralmente, o condicionamento massal (seqüência rápida de apresentações de CS seguido por US) conduz a uma performance deficiente da memória em relação ao condicionamento espaçado (apresentação das trilhas com intervalos de tempo). Quanto maior o intervalo, melhor a aquisição e mais alta a retenção (*Apis mellifera*).

Contudo, em outros trabalhos que propuseram protocolos de condicionamento olfatório parecidos ao utilizado no presente estudo, as abelhas sem ferrão testadas apresentam respostas muito baixas (McCabe *et al.*, 2007) ou somente conseguiram deflagrar o reflexo de extensão com a apresentação de mel da própria espécie (*Melipona scutellaris*) para a realização do condicionamento, também sem aquisição com a utilização

dos seguintes estímulos condicionados: geraniol, citral, hexanal, cêra de colônia de abelha melífera e de *M. scutellaris* (Abramson *et al.*, 1999).

No início de execução desta tese, vários protocolos para o condicionamento olfatório foram testados. O descrito na seção material e método deste capítulo foi aquele no qual as abelhas se mantiveram ativas/motivadas durante todo o experimento, desde a coleta do indivíduo até o final do teste de tomada de decisão, com exceção das abelhas que morreram no condicionamento CS-. Nos demais, ou as abelhas morriam durante o condicionamento ou dentro da caixa de teste para tomada de decisão. Nesses outros protocolos foram consideradas as variáveis como o tempo de exposição do odor (10 e 15 segundos), tempo de intervalo entre as trilhas (10 e 15 minutos) e o número de trilhas (até 15 trilhas). Em nenhum destes protocolos foi verificada resposta das abelhas que sinalizasse aquisição.

Depois do frustrante resultado, o teste de tomada de decisão surpreendentemente, demonstrou que as abelhas que receberam reforço nas trilhas do condicionamento escolheram o mesmo odor no alimentador dentro da caixa de teste, a diferença é notável quando comparamos as escolhas das abelhas que não passaram pelo condicionamento. Provavelmente, o estímulo olfatório do condicionamento foi determinante para a preponderância da escolha pelo alimentador que apresentava o mesmo odor (Figura 1.11). Entretanto, as respostas no teste de tomada de decisão do grupo de abelhas que passaram pelo condicionamento sem o reforço, somente encontramos diferença nas escolhas das abelhas do grupo que foram estimuladas pelo Linalool. Notamos certa modulação da tomada de decisão após a fase de condicionamento CS+ e CS-. Esta alteração do comportamento de decisão nos conduz a discutir e reavaliar alguns pontos. A metodologia, enquanto delineamento experimental (tempo, hora do dia, preparação das abelhas), o tipo de estímulo (odor, cor, padrões geométricos, vibração), o momento de

apresentação do estímulo em relação ao reforço, a concentração e a quantidade de reforço, e, finalmente como realizar o teste de tomada de decisão. No presente experimento, uma caixa foi usada para verificar a decisão das abelhas em relação aos alimentadores com papel filtro embebidos em solução de odor (Figura 1.3). Assim os odores se dispersavam pela caixa e isso pode ter gerado um ambiente complexo de tal maneira que as escolhas pelo alimentador somente com sacarose tenha sido feita com a utilização do odor que se volatilizou mais intensamente dentro da caixa. Uma alternativa seria a utilização de um Y-maze, no qual as escolhas certamente teriam sido dirigidas pelo odor apresentado no condicionamento.

Finalmente, este capítulo considera a habilidade das operárias de *M. scutellaris* de utilizar informação olfatória como um dos vetores que dirige a tarefa de forragear, porém, muito ainda deve ser elaborado e testado em relação ao protocolo experimental (PER) para ser utilizado nas abelhas sem ferrão, ou até mesmo, estabelecer um novo protocolo específico.

## 1.5. Conclusões

- As operárias de *Melipona scutellaris* não apresentaram aquisição durante o condicionamento clássico olfatório desenvolvido através do protocolo experimental de reflexo de extensão da probóscide estabelecido para *Apis mellifera*.
- A informação de odor apresentada como estímulo condicionado durante o condicionamento modulou a resposta das abelhas durante a tomada de decisão na fase de teste.

## Capítulo 2

### Aprendizagem Contextual em *Melipona scutellaris*

Roselino AC, Hrnir M, Zucchi R. 2007. Stingless bees (*Melipona scutellaris*) learn to associate their "footprints" with depleted food sources. *Insectes sociaux* 2007 - Colloque Section Française UIEIS\* - Toulouse - França \*Seção francesa do IUSSI, p. 75.

Rodrigues AV, Roselino AC, Hrnir M. 2008. Stingless bees (*Melipona scutellaris*) learn to associate their "footprints" with rewarding food sources. Ribeirão Preto, SP, Brazil: Anais VIII° Encontro sobre Abelhas, p. 546.

Hrnir M, Roselino AC, Rodrigues AV, Zucchi R. 2009. Stingless bee footprints at food sources - repellents, attractants or both? In: 46th Annual Meeting of the Animal Behavior Society, 2009, Pirinópolis. 46th Annual Meeting of the Animal Behavior Society, 2009. v. 46. p. 90-91.

#### 2.1. Introdução

Questões sobre o valor adaptativo do comportamento forrageador permanecem relativamente inexploradas. Pouco foi esclarecido sobre a contribuição das estratégias de forrageamento para o *fitness* dos animais em contexto natural (Raine & Chittka, 2009). Porém, os estudos sobre este comportamento revelam perguntas relacionadas diretamente com as decisões tomadas pelos indivíduos, são elas: quais os tipos de alimentos que serão consumidos (Pyke *et al.*, 1977; Waddington & Holden, 1979; Stephens & Krebs, 1986), quando abandonar determinada fonte (Kacelnik & Krebs, 1985; Cuthill *et al.*, 1990), como a variedade de alimento disponível afeta as escolhas (Real, 1981; Shafir *et al.*, 1999; Fülöp & Menzel, 2000; Chittka, 2002) e, finalmente, qual a "moeda" que os animais usam quando decidem sobre a qualidade do alimento (Schmid-Hempel *et al.*, 1985; McNamara *et al.*, 1993). Provavelmente, o real valor das estratégias de forrageamento seja afetado por aspectos variados do comportamento animal, como por exemplo, o aprendizado ou as

modificações adaptativas do comportamento baseada na experiência (Raine & Chittka, 2009). Experimentos em laboratório sugerem que a capacidade de aprender de alguns insetos gera benefícios para o *fitness*, pois estes animais são capazes de formarem associação entre pistas ambientais (odor, cor e localização) e o recurso alimentar, porém ainda não se sabe ao certo, em condições naturais o custo do aprendizado para estes animais (Mery & Kawecki, 2004; 2005). Uma vez fora do ninho, uma abelha forrageia em um ambiente complexo e dinâmico que apresenta flores que diferem em qualidade e quantidade de recurso ao longo do tempo (Willmer & Stone, 2004). Este indivíduo deve estimar estas diferenças e responder com um comportamento adequado (Chittka, 1998; Menzel, 2001; Raine & Chittka, 2007; 2008). O rápido aprendizado das pistas florais parece permitir às abelhas se atualizarem sobre as alterações de oferta dos recursos, aperfeiçoando a eficiência do forrageamento através da escolha por flores que são aparentemente mais lucrativas (Raine *et al.*, 2006).

No caso das abelhas sociais, sabemos que marcas de odor deixadas no ambiente por co-específicas e hetero-específicas podem influenciar nas decisões individuais das forrageadoras na busca por alimento e parecem aumentar a eficiência de forrageamento do indivíduo (Wetherwax, 1986; Kato, 1988; Schmitt & Bertsch, 1990; Giurfa & Nuñez, 1992; Nieh *et al.*, 2004).

A estratégia de deixar marcas químicas sobre fontes de alimento é um fenômeno comum e bastante estudado em abelhas sociais, *Apis mellifera* e *Bombus sp* (abelhas melíferas: Nuñez, 1967; Ferguson & Free, 1979; Free & Williams, 1983; Corbet *et al.*, 1984; Giurfa & Nuñez, 1992; Giurfa, 1993; Williams, 1998; *Bombus sp*: Cameron, 1981; Schmitt & Bertsch, 1990; Goulson *et al.*, 1998; Stout *et al.*, 1998; Stout & Goulson, 2001; Witjes & Eltz, 2007; Wilms & Eltz, 2008). O tempo gasto com flores não rentáveis é reduzido na medida em que aumenta a procura objetiva por flores rentáveis. Considerando

este balanço, as marcas de odor podem representar um contexto atrativo ou repelente (Hrncir *et al.*, 2004 a; Jarau *et al.*, 2004 b; Schmidt *et al.*, 2005; Witjes & Eltz, 2007; Jarau 2009). Notavelmente, as abelhas sem ferrão deixam marcas de odor como indicador de alimento disponível, atraindo novas forrageadoras co-específicas para a fonte de alimento (Nieh *et al.*, 2003; Hrncir *et al.*, 2004 a; Jarau *et al.*, 2004 a; Jarau, 2009; Lichtenberg *et al.*, 2009). Mas, todos os estudos apresentados até agora utilizam fontes de alimento (solução de sacarose) artificial *ad libitum*, que contrasta com a condição natural, na qual as flores ou inflorescências não fornecem uma grande quantidade de néctar constantemente, ao contrário, geralmente oferecem apenas uma quantidade limitada de recurso, provavelmente o suficiente para uma única visita (Stout & Goulson, 2002; Wilms & Eltz, 2008). Assim, neste capítulo, desenhamos dois contextos experimentais para avaliar a capacidade das forrageadoras de *Melipona scutellaris* de associar os sinais químicos deixados por co-específicas com a ausência e com o aumento de concentração de sacarose.

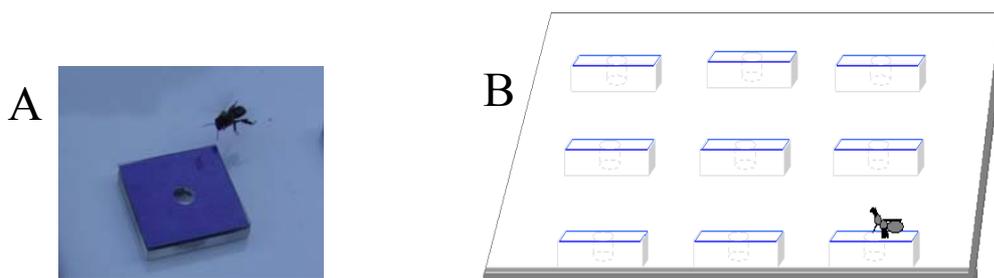
## 2.2. Material e Métodos

### 2.2.1. Equipamentos

**2.2.1.1.** Tripé de 90 cm de altura com uma placa de Petri (15 cm de diâmetro) adaptada como suporte para um alimentador. Usado para treinar as abelhas a voarem até o local do experimento a 30 m da colônia.

**2.2.1.2.** Tripé de 90 cm de altura com uma placa de madeira: 40 cm x 20 cm como suporte para os alimentadores, tratado por *setup*.

**2.2.1.3.** Nove alimentadores de acrílico (Figura 2.1A) com papel cartão azul e cobertura de acrílico, ambos com dimensões: 3,0 x 3,0 x 0,5 cm. Dispostos como uma matriz 3 x 3 compuseram o arranjo de alimentadores usado durante o condicionamento (Figura 2.1 A e B). Outros alimentadores idênticos estavam disponíveis para as substituições que ocorreram durante o condicionamento (2.2.4) e o teste (2.2.6).



**Figura 2.1.** (A) Alimentador de acrílico com papel cartão azul e cobertura de acrílico (3,0 x 3,0 x 0,5 cm) usado para compor o arranjo de alimentadores usado durante o Condicionamento. (B) Arranjo de alimentadores numa matriz 3 x 3.

**2.2.1.4.** Como verificado por Hrncir *et al.* (2004 a), Schmidt *et al.* (2005) e Lichtenberg *et al.* (2009), as operárias forrageadoras deixam sinais químicos nos alimentadores artificiais para guiar outras operárias da colônia ao local com alimento disponível. Estes sinais químicos serão tratados a partir daqui como SQ.

**2.2.1.5.** Solução de água e sacarose a 20% w/w (Condicionamento Contextual 1) e a 55% w/w (Condicionamento Contextual 2): tratadas por + e +<sup>+</sup>, respectivamente. Sacarose (99,5% - C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> - Sigma<sup>®</sup>).

## **2.2.2. Treinamento das Abelhas**

No período de outubro de 2007 a março de 2008, operárias forrageadoras foram treinadas a visitar um arranjo de alimentadores a 30 metros da colônia. Usando o tripé com um alimentador e solução da sacarose a 20% (+) posicionado em frente à colônia, as abelhas podiam coletar alimento *ad libitum*. Este tripé foi afastado da colônia a cada 2 metros em direção ao local do experimento quando havia pelo menos 3 abelhas pousadas, bebendo a solução de sacarose. Durante esta fase cada uma das abelhas recebeu sua identificação (Figura 2).

No local do experimento as abelhas puderam visitar o alimentador posicionado ao lado de um tripé com o arranjo de alimentadores 3 x 3 (Figura 2.1B) até que demonstrassem interesse pelo *setup*, quando então o tripé de treinamento era retirado. Essa técnica foi utilizada no Condicionamento Contextual 1 e 2. Para evitar que varias abelhas estivessem no *setup* ao mesmo tempo durante o condicionamento, todas as abelhas, fora o indivíduo a ser condicionado, foram capturadas com rede entomológica e mantidas dentro de uma caixa até o fim do respectivo experimento.

### **2.2.3. Preparação do *Setup* (Condicionamento Contextual 1 e 2)**

Uma matriz 3 x 3 de alimentadores de acrílico (Figura 2.1B) foi preparada. Cada alimentador continha 5 µl de solução de sacarose 20% (+).

### **2.2.4. Condicionamento Contextual 1: Associação entre SQ e Ausência de + = Efeito Repelente**

O condicionamento foi individual (N = 30). A abelha durante esta fase devia visitar o *setup* 10 vezes. A cada visita\* em um alimentador a abelha deixa sobre a cobertura de acrílico SQ. Depois de cada visita o alimentador era trocado por outro vazio, mas a cobertura de acrílico com SQ era mantida, ou seja, o alimentador visitado apresentava o sinal químico deixado pela abelha e não havia mais alimento (+). Objetivo: condicionar as abelhas a associar SQ com ausência de +.

\*Foi considerado como visita quando a abelha pousava no alimentador e inseria a cabeça no orifício central do alimentador para beber a solução de sacarose.

### **2.2.5. Condicionamento Contextual 2: Associação entre SQ e Aumento na Concentração + (+<sup>+</sup>) = Efeito Atraente**

Durante o condicionamento, realizado individualmente (N = 30), cada abelha devia visitar o *setup* 10 vezes. A cada visita\*, a abelha deixa sobre a cobertura de acrílico do alimentador o SQ. Depois de cada visita, a cobertura era mantida, mas o alimentador era trocado por outro com solução de sacarose 55% (+<sup>+</sup>).

### **2.2.6. Teste de Contextualização 1 e 2**

Depois da 10<sup>a</sup> visita, enquanto a abelha retornava para a colônia, o *setup* para a realização do Teste de Contextualização era preparado alterando o arranjo de alimentadores. Neste teste havia apenas 2 alimentadores: um com SQ e +, e outro com somente +.

Considerado como a 11<sup>a</sup> visita ao *setup*, na qual as abelhas deveriam escolher o alimentador sem SQ, demonstrando terem aprendido a relação sinal químico - ausência de alimento, depois do Condicionamento Contextual 1, ou, depois de passarem pelo Condicionamento Contextual 2, as abelhas deveriam escolher o alimentador com SQ, demonstrando terem aprendido a relacionar SQ com o aumento de concentração de sacarose.

### **2.2.7. Grupo Controle**

As abelhas foram treinadas como descrito em 2.2.2, porém no *setup* havia somente 2 alimentadores. Cada abelha devia visitar o *setup* 2 vezes, na 1<sup>a</sup> visita deixam o sinal químico em um dos alimentadores. Na segunda visita, o grupo controle para comparações com as abelhas que passaram pelo Condicionamento Contextual 1 (N = 23) devem ser capazes de escolher o alimentador sem SQ e o grupo controle para comparações com as abelhas que passaram pelo Condicionamento Contextual 2 (N = 30) devem ser capazes de escolher pelo alimentador no qual há SQ.

### **2.2.8. Análise Estatística**

Comparação entre as escolhas realizadas pelas abelhas durante os Testes de contextualização 1 e 2: *Qui-quadrado*,  $P < 0,05$  e, comparação entre as proporções de escolhas entre as abelhas do Teste de Contextualização 1 e 2 e os respectivos Grupos controle: *Fisher's Exact Probability Test*,  $P \leq 0,05$ .

### **Agradecimento**

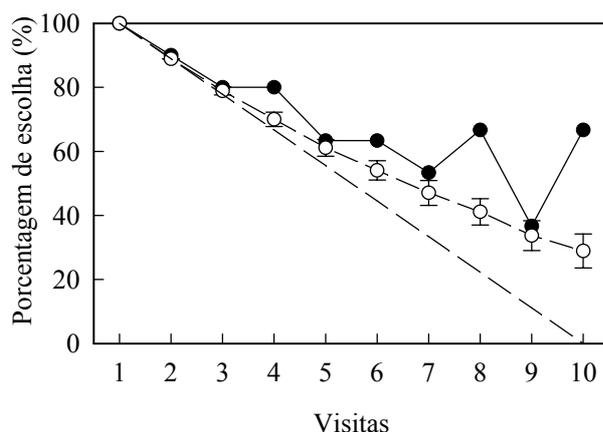
Ao André Vieira Rodrigues, aluno de Iniciação Científica, pela participação no desenvolvimento dos experimentos.

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Condicionamento Contextual 1: Associação entre SQ e Ausência de + = Efeito Repelente

Chegando ao *setup* as abelhas escolhiam um alimentador, pousavam e coletavam todo o alimento disponível (5  $\mu$ l), rapidamente iam à colônia e retornavam ao *setup* demonstrando motivação, condição que valoriza a técnica utilizada. As abelhas não visitaram mais de um alimentador a cada chegada ao *setup*.

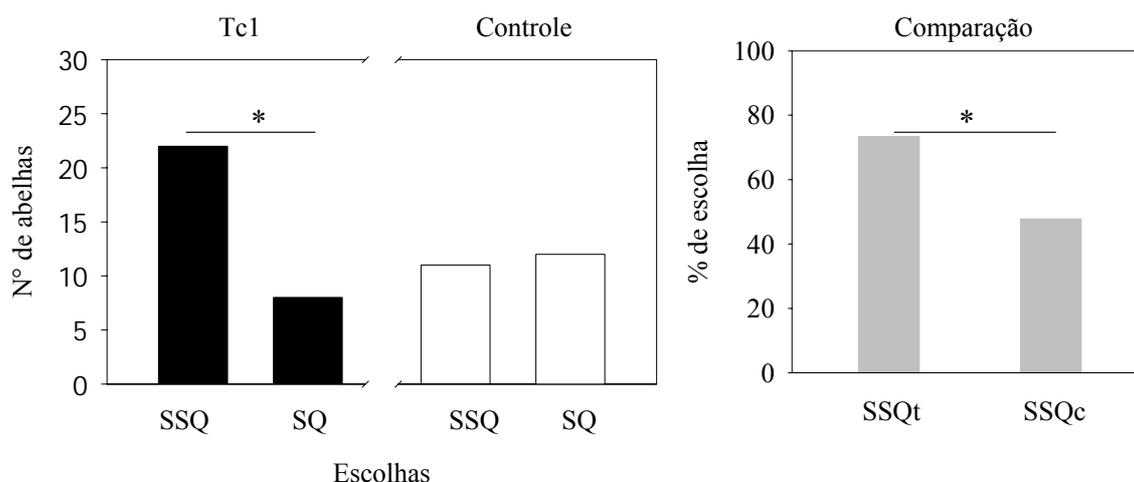
A Figura 2.2 ilustra numa reta a probabilidade da abelha encontrar um alimentador não marcado a cada visita, se a cada visita a abelha marcar 1 novo alimentador. A curva com círculos vazios representa a probabilidade de ter alimentadores marcados a cada volta da abelha ao *setup*. Esta probabilidade considera as vistas em alimentadores anteriormente marcados. O círculo cheio representa a porcentagem real de escolha das abelhas, pode também ser chamada de Curva de Aprendizagem. Nesta curva a porcentagem de escolha por alimentadores não marcados com SQ durante a 4ª visita ao *setup* chega a 80%. Depois disso, mesmo com uma diminuição da porcentagem das abelhas, elas continuam a escolher por alimentadores que não haviam sido marcados. Nas visitas 6, 8 e 10 mais de 60% das escolhas são por alimentadores sem SQ. Este resultado se confirma durante o Teste de contextualização no qual 70% das abelhas escolheram o alimentador não marcado na segunda visita ao *setup*.



**Figura 2.2.** Condicionamento Contextual 1: associação entre sinal químico (SQ) e ausência de alimento - Efeito Repelente (N = 30). A reta representa a probabilidade de uma abelha encontrar um alimentador não marcado a cada visita, se a cada visita a abelha marcar 1 novo alimentador. A reta com círculos vazios representa a probabilidade de ter alimentadores marcados a cada volta da abelha ao *setup*. O círculo cheio representa porcentagem real de escolha por alimentadores não marcados = Curva de Aprendizagem.

### 2.3.2. Teste de Contextualização 1

A Figura 2.3 Tc1 representa o número de abelhas que escolheram pelo alimentador sem sinal químico (SSQ) demonstrando a eficiência do condicionamento. *Qui-quadrado*:  $X^2 = 6,53$  (P = 0,01) (N = 30). Portanto as abelhas foram capazes de associar SQ com a ausência de alimento. Para o Grupo controle (Figura 2.3 Controle), não foi encontrada diferença número de abelhas que escolheram entre os alimentadores SSQ e SQ, ou seja, as abelhas sem passarem pelo condicionamento não foram capazes de relacionar a presença de SQ com ausência de alimento. Proporcionalmente, a escolha por SSQ pelas abelhas do Teste de Contextualização 1 foi maior do que a proporção da mesma escolha feita pelo grupo controle. *Fisher's Exact Probability Test*, P = 0,05.

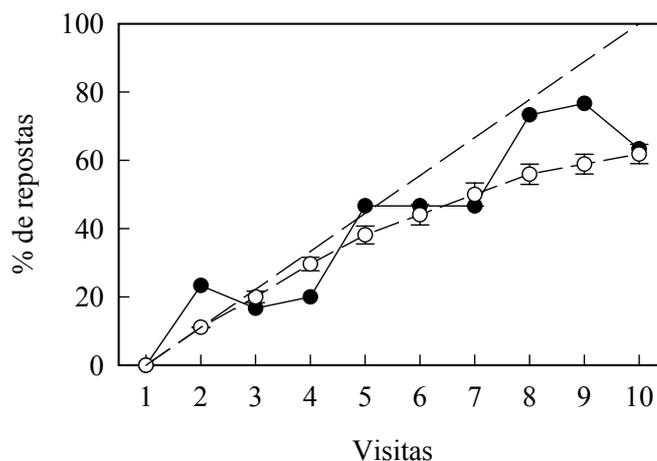


**Figura 2.3.** Tc1: Teste de Contextualização 1 (N = 30), número de abelhas que escolheram pelo alimentador SSQ durante a segunda visita ao *setup* (*Qui-quadrado*:  $X^2 = 6,53$ ,  $P = 0,01$ ). Controle: Grupo controle (N = 23), número de abelhas que escolheram por um dos alimentadores (SSQ ou SQ) sem terem passado pela fase de condicionamento. Comparação: Porcentagem de escolha das abelhas pelo alimentador não marcado (SSQ) durante Teste de Contextualização 1 e no Grupo controle (*Fisher's Exact Probability Test*,  $P = 0,05$ ). SSQ: alimentador sem sinal químico, SQ: alimentador com sinal químico, SSQt: alimentador sem sinal químico – proporção do grupo teste, SSQc: alimentador sem sinal químico – proporção do grupo controle.

### 2.3.3. Condicionamento Contextual 2: Associação entre SQ e Aumento na Concentração + (+<sup>+</sup>) = Efeito Atraente

A Figura 2.4 ilustra as escolhas das abelhas durante o Condicionamento Contextual 2. A curva com círculos pretos informa que durante as 5 últimas visitas, com exceção da 7<sup>a</sup>, as escolhas foram feitas pelos alimentadores que haviam sido anteriormente marcados.

Nas 3 últimas visitas ao *setup*, mais de 50% das abelhas escolheram o alimentador que havia SQ, demonstrando possível aquisição da relação de SQ com o aumento na concentração de sacarose do alimento.

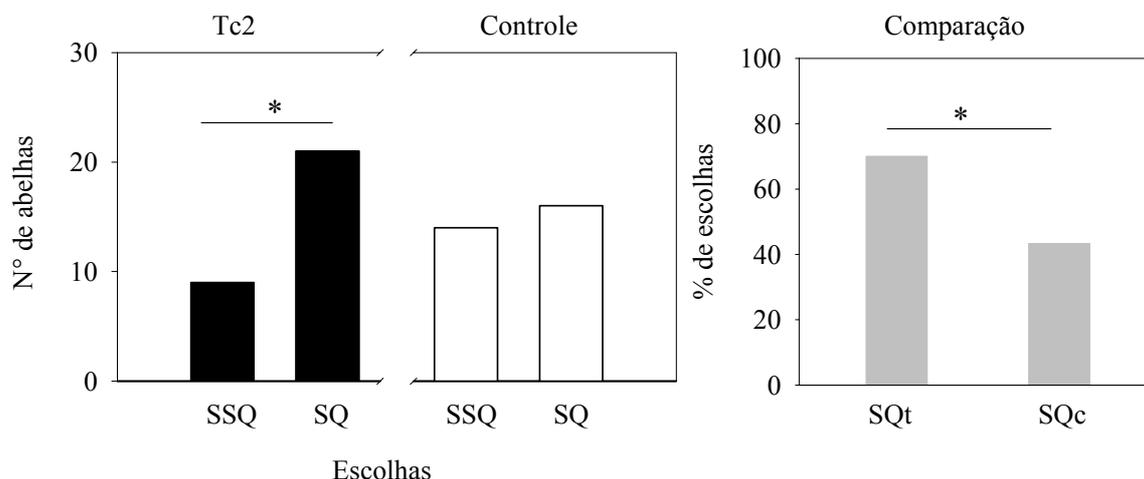


**Figura 2.4.** Condicionamento Contextual 2: associação entre sinal químico (SQ) e aumento na concentração de sacarose do alimento (+<sup>+</sup>) – Efeito Atraente (N = 30). A reta representa a probabilidade de uma abelha encontrar 1 alimentador marcado, se a cada visita a abelha marcar 1 novo alimentador. A reta com círculos vazios representa a probabilidade de ter alimentadores marcados a cada volta da abelha ao *setup*. O círculo cheio representa porcentagem real de escolha por alimentadores marcados = Curva de Aprendizagem.

Durante o teste de contextualização 2 a aquisição do condicionamento se confirma através do número de abelhas que, durante a segunda visita ao *setup* escolheram pelo alimentador com SQ, *Qui-quadrado*:  $X^2 = 4,8$  ( $P = 0,02$ ) (N = 30) (Figura 2.5 Tc2). Na mesma figura ainda, o gráfico que representa o número de abelhas que escolheram cada tipo de alimentador sem antes terem sido condicionadas (Controle), acentua a importância da experiência na tomada de decisão por alimentadores mais lucrativos. Praticamente o mesmo número de abelhas escolheram tanto o alimentador marcado (SQ = 55% de concentração de sacarose), quanto o não marcado (SSQ = 20% de concentração de sacarose).

Ao compararmos a proporção das escolhas pelo alimentador marcado (SQ) pelo grupo de abelhas que foram condicionadas (SQ<sub>t</sub>) e pelo grupo que não passaram pelo condicionamento (SQ<sub>c</sub>), encontramos significativa diferença (Figura 2.5 Comparação: *Fisher's Exact Probability Test*,  $P = 0,05$ ). Esse resultado corrobora com o anterior (Figura

2.5 Tc2) afirmando a aquisição do processo de condicionamento através da maior proporção de escolha pelo alimentador previamente marcado, o qual passava a ter uma oferta de alimento com maior concentração de sacarose.



**Figura 2.5.** Tc2: Teste de Contextualização 2 (N = 30), número de abelhas que escolheram pelo alimentador SSQ durante a segunda visita ao *setup* (*Qui-quadrado*:  $X^2 = 4,8$  (P = 0,02). Controle: Grupo controle (N = 30), número de abelhas que escolheram por um dos alimentadores (SSQ ou SQ) sem terem passado pela fase de condicionamento. Comparação: Porcentagem de escolha das abelhas pelo alimentador marcado (SSQ) durante Teste de Contextualização 2 e no Grupo controle (*Fisher's Exact Probability Test*, P = 0,05). SSQ: alimentador sem sinal químico, SQ: alimentador com sinal químico, SQt: alimentador com sinal químico – proporção do grupo teste, SQc: alimentador com sinal químico – proporção do grupo controle.

## 2.4. Discussão

As abelhas sem ferrão usam seus sinais químicos como pistas olfatórias durante a escolha por uma fonte de alimento. Na maioria dos casos estudados essas marcas atraíram forrageadoras para a fonte alimentar (Villa & Weiss, 1990; Nieh, 1998; Schmitd *et al.*, 2003, 2005; Hrncir *et al.*, 2004 a; Jarau *et al.*, 2004 a, b). Porém, todos esses trabalhos utilizaram alimentadores artificiais oferecendo alimento ilimitado, portanto, uma condição atrativa. No único estudo com flores naturais (Goulson *et al.*, 2001), foi observado que as visitas das abelhas *Trigona fulviventris* e *T. fuscipennis* não foram dirigidas exclusivamente para flores previamente visitadas ou para as flores não visitadas, demonstrando que em condição natural, os sinais químicos podem não ser necessariamente atraentes para novas forrageadoras.

Recentemente, foi verificado que as forrageadoras de abelhas do gênero *Bombus* (Saleh & Chittka, 2006; Witjes & Eltz, 2007) usam suas marcas químicas em dependência da recompensa, ou seja, aquelas flores que não tinham néctar *ad libitum* foram significativamente rejeitadas pelas abelhas quando nelas havia sinais de abelhas precursoras e, por outro lado, as marcas químicas em fontes com alimento ilimitado atraíram as forrageadoras. Seguindo as informações destes trabalhos podemos concluir que o contexto no qual os sinais químicos são percebidos e aprendidos, pode modular a resposta comportamental das abelhas, conduzindo a eleição ou à rejeição de determinada fonte.

Nos resultados do presente trabalho podemos avaliar que as forrageadoras de *Melipona scutellaris* foram capazes de usar seus sinais como um marcador repelente ou atraente de acordo com o contexto aprendido na fase de condicionamento. As curvas de aprendizado (Figuras 2.2 e 2.4) representam esta habilidade (curvas com círculos cheios).

No primeiro experimento (Condicionamento Contextual 1: associação entre sinal químico (SQ) e ausência de alimento - Efeito Repelente), 60% das decisões das abelhas durante o condicionamento foram pelos alimentadores não marcados. Este resultado foi um indício da utilização da própria informação química para evitar alimentadores que já haviam sido visitados anteriormente. Durante o teste de contextualização, o número de abelhas que escolheram pelo alimentador sem sinal químico corroborou com a primeira informação (Figura 2.3 Tc1). E, finalmente, a diferença encontrada na comparação entre as proporções das escolhas pelo alimentador sem sinal químico, pelo grupo de abelhas condicionadas e não condicionadas, contribuiu fortemente para a comprovação da habilidade de *Melipona scutellaris* em utilizar suas próprias marcas químicas de acordo com o contexto aprendido (*Fisher's Exact Probability Test*,  $P = 0,05$ ).

No segundo experimento, os sinais químicos representavam aumento da lucratividade do alimento. A experiência em visitar um alimentador marcado deveria ser atraente. Mas, ao observarmos a Figura 2.4, notamos que nas 3 últimas visitas, mais de 50% das abelhas escolheram o alimentador marcado, mas, o *setup* apresentava 50% dos alimentadores marcados, enquanto que o esperado seria que uma pequena proporção de alimentadores fosse marcada e revisitada durante o condicionamento, confirmando o contexto atraente do *setup*. A partir desta constatação, inferimos que o sinal químico pode ser utilizado como um indicador, porém alguma outra característica desta marca pode ser avaliada pelas abelhas durante a tomada de decisão. Considerando isto, surgem duas hipóteses, uma relacionada à concentração destes sinais e outra sobre a origem deles. Talvez várias marcas sobre a mesma fonte seja uma condição significativamente mais atrativa do que apenas uma marca. A segunda hipótese se refere à origem do sinal químico, sendo este de outra abelha da mesma espécie, ou ainda de outra espécie. Contudo, a comparação das proporções das escolhas entre os grupos, abelhas que passaram pelo

condicionamento e abelhas do grupo controle encontramos uma significativa diferença (*Fisher's Exact Probability Test*,  $P = 0,05$ ).

O grupo controle de ambos os contextos evidencia que a experiência pode ser um fator decisivo para a adequação do comportamento forrageador relacionado ao contexto. Essas abelhas passaram somente pelo teste de contextualização, e durante a tomada de decisão na segunda visita ao *setup* o número de abelhas que escolheu entre os alimentadores, marcado e não marcado, não foi diferente (Figuras 2.3 Controle e 2.5 Controle).

A aprendizagem, ou a modificação adaptativa de um comportamento com base na experiência, afeta praticamente todos os aspectos do comportamento animal (Raine & Chittka, 2008). O estudo controlado realizado neste capítulo pretendeu através da avaliação da performance cognitiva das abelhas, estimar o valor adaptativo do aprendizado para o comportamento forrageador em condições próximas da natural (Shettleworth, 1998; Dukas, 2004). Os resultados representam um grande passo em direção ao reconhecimento de como a evolução das habilidades cognitivas é moldada pelo ambiente e como a performance de aprendizado se correlaciona com as diferentes demandas ecológicas das diferentes espécies.

## 2.5. Conclusões

- As abelhas operárias de *Melipona scutellaris* são capazes de aprender o contexto no qual encontram sua própria marca de odor (sinal químico) deixada sobre alimentadores artificiais. Os condicionamentos resultaram em curvas típicas de aprendizado associativo.
- Durante teste de contextualização 70% as abelhas escolheram o alimentador de acordo com o condicionamento. No primeiro caso, o sinal químico deixado pela forrageadora indicava ausência de alimento, portanto a escolha adequada era pelo alimentador sem o sinal, no segundo caso, o sinal químico era indicativo de aumento na concentração de sacarose, tornando o alimentador marcado atrativo.

## Capítulo 3

### Estudo Neuro-anatômico do Lobo Antenal de *Melipona scutellaris*:

#### Possível Significância na Percepção de Feromônios

Roselino AC, Sandoz JC, Hrnecir M, Giurfa M. Three-Dimensional Antennal Lobe Atlas of the stingless bee *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) *em preparação*

### 3.1. Introdução

O sentido olfatório tem função crucial no comportamento e na fisiologia dos insetos sociais. A habilidade individual em detectar e reconhecer notável número de sinais químicos é provavelmente um dos fatores chave para o sucesso de sua socialidade. Além disso, odores específicos, como os feromônios, são essenciais para a sobrevivência e organização do comportamento social, como comprovado em trabalhos sobre a homeostase da colônia (*primer pheromone*: Le Conte & Hefetz, 2008), no reconhecimento de companheiros de ninho (feromônio de agregação social: Châline *et al.*, 2005), na defesa do ninho (feromônio de alarme: Fujiwara-Tsujii *et al.*, 2006, Schorkopf *et al.*, 2009), e como sinal de fertilidade (componentes do feromônio da rainha: Free, 1987, Winston, 1987).

Contudo, possivelmente, o melhor exemplo estudado sobre a importância dos sinais químicos no comportamento social seja a exploração coordenada das fontes de alimentos (revisado em: Detrain & Deneubourg, 2009; Jarau, 2009; Reinhard & Srinivasan, 2009). Diversas espécies de abelhas, formigas e cupins utilizam feromônios para aumentarem a eficiência do forrageamento (Wetherwax, 1986; Kato, 1988; Schmitt & Bertsch, 1990; Giurfa & Nuñez, 1992; Slaa *et al.*, 1997; Pasteels & Bordereau, 1998; Traniello & Leuthold, 2000; Jarau *et al.*, 2003). Um caso particular, são as abelhas sociais, que

depositam marcas de odor no ambiente, podendo assim, influenciar nas decisões individuais das forrageadoras na busca por alimento (abelhas melíferas: Nuñez, 1967; Ferguson & Free, 1979; Free & Williams, 1983; Corbet *et al.*, 1984; Giurfa & Nuñez, 1992; Giurfa, 1993; Williams, 1998; *Bombus sp.*: Cameron, 1981; Schmitt & Bertsch, 1990; Goulson *et al.*, 1998; Stout *et al.*, 1998; Stout & Goulson, 2001). Os sinais químicos deixados por abelhas sem ferrão (Meliponini) guiam suas companheiras desde o ninho até a fonte de alimento (Jarau *et al.*, 2003; 2006; Biesmeijer & Slaa, 2004; Aguilar *et al.*, 2005; Schorkopf *et al.*, 2007; Jarau, 2009). Entretanto, para que estas marcas sejam eficientes para as operárias que as seguem, é necessário que seu sistema olfatório seja capaz de detectar e processar estas informações específicas, provenientes das pistas químicas (Kleineidam *et al.*, 2005; Zube *et al.*, 2008).

As abelhas recebem uma informação de odor pela ativação dos neurônios de recepção olfatória (ORNs), localizado nas sensilas das antenas. Os neurônios de recepção olfatória se projetam nas estruturas primárias presentes no deutocerebro dos insetos, os lobos antenais (neurópilos). Duas estruturas esferoidais consistindo de um arranjo de glomérulos (Shepherd, 1974; Baumann *et al.*, 1996), onde ocorrem os contatos sinápticos entre os axônios dos neurônios de recepção olfatória (ORNs), inter-neurônios locais (LNs) e neurônios de projeção (PNs) (Homberg *et al.*, 1988; Winnington *et al.*, 1996; Anton & Homberg, 1999; Kanzaki *et al.*, 2003). Após o processamento neural pela rede de inter-neurônios locais (LNs), a informação olfatória é passada via neurônios de projeção (PNs) para o centro de integração localizado no protocerebro. O centro de integração é composto pelos *mushroom bodies* (MB) e pelo lobo lateral no protocerebro (LPL), mais proeminente nas córneas laterais (LH) (Schildberger, 1983; Kanzaki *et al.*, 1989; Malun *et al.* 1993; Hildebrand, 1996; Anton & Homberg, 1999; Kanzaki *et al.*, 2003; Zube *et al.*, 2008).

O arranjo glomerular constitui um mapa topográfico da qualidade dos odores, sendo, portanto, a base neural para a compreensão sobre a codificação dos sinais de odores (Vosshall *et al.*, 2000; Kirschner *et al.*, 2006). Cada glomérulo representa uma unidade funcional para o processamento de informações olfatórias complexas (Hildebrand & Shepherd, 1997; Galizia & Menzel, 2001), como todos os ORNs têm uma dada proteína receptora que converge para o mesmo glomérulo, a identidade de cada glomérulo é determinada pela especificidade do neurônio de recepção olfatória (Vosshall *et al.*, 2000).

Estudos de neuro-anatomia comparativa em insetos mostraram que diferenças em número e tamanho/volume das unidades são específicas para cada espécie (Chambille & Rospars, 1981; Rospars, 1988; Vickers *et al.*, 1998; Berg *et al.*, 2002; Kleineidam *et al.*, 2005) e que o arranjo e a morfologia dos glomérulos são altamente estereotipados entre os indivíduos da mesma espécie e da mesma casta (Arnold *et al.*, 1985; Flanagan & Mercer, 1989; Galizia *et al.*, 1999, Rospars & Hildebrand, 2000, Huetteroth & Schachtner, 2005, Kleineidam *et al.*, 2005, Masante-Roca *et al.*, 2005, Nishikawa *et al.*, 2008).

Imagens de cálcio fluorescente nos lobos antenais de abelhas melíferas revelaram que cada estímulo olfatório leva a um padrão de ativação espaço-temporal específico, o qual é similar entre os indivíduos da mesma espécie (Joerges *et al.*, 1997; Galizia *et al.*, 1999; Galizia & Menzel, 2000). Além disso, foi demonstrado que odores quimicamente similares, ativam um grupo similar de glomérulos (Joerges *et al.*, 1997) e que, a ativação glomerular induzida por odores específicos é simétrica entre os lobos direito e esquerdo (Galizia *et al.*, 1999; Sandoz *et al.*, 2003).

Os lobos antenais de machos (*Apis mellifera*), por exemplo, possui alguns glomérulos hiper-trofiados denominados como um complexo macro-glomerular (Arnold *et al.*, 1985). Estes glomérulos processam alguns componentes do feromônio produzido pela rainha (Sandoz, 2006). Outro famoso exemplo sobre a ocorrência de macro-glomérulos nos

lobos antenais de insetos é o caso das mariposas noturnas (Hansson & Anton, 2000). Neste exemplo, o complexo macro-glomerular próximo ao nervo antenal dos machos, respondem especificamente para o feromônio sexual das fêmeas, induzindo e guiando o macho a procurar e encontrar a fêmea. Outros exemplos que se destacam em relação ao dimorfismo sexual do sistema olfatório são o da mariposa *Agrotis ipsilon* (*black cutworm*) (Greiner *et al.*, 2004) e das traças do tabaco, *Helicoverpa assulta* e *Heliothis virescens* (Berg *et al.*, 2002).

Os complexos macro-glomerulares têm sido descritos em casos em que a atração sexual dos indivíduos é irrelevante, como por exemplo, a casta estéril de certas formigas. Aqui, a proposição sobre as estruturas macro-glomerulares está relacionada à detecção de odores não sexuais, como feromônios de trilhas (*Atta sexdens*, *Atta vollenweideri*: Kleineidam *et al.*, 2005), feromônios de alarme (*Camponotus obscuripes*: Yamagata *et al.*, 2007), e até mesmo odores não feromonais (*Camponotus floridanus*: Zube *et al.*, 2008).

As forrageadoras de abelhas sem ferrão que deixam feromônios não sexuais sobre uma fonte de alimento, os *footprints* (Hrncir *et al.*, 2004 a; Jarau *et al.*, 2004 a, b; 2006). Este composto informa as outras forrageadoras sobre a natureza e a localidade da fonte alimentar (Nieh, 2004; Barth *et al.*, 2008). Ademais, durante experimentos com alimentadores artificiais, *M. scutellaris* mostrou habilidade de contextualizar a informação dos *footprints* com a lucratividade do alimento (veja Capítulo 2). Roselino *et al.* (2007) e Rodrigues *et al.* (2008) condicionaram forrageadoras desta espécie para identificar os *footprints* como marcas repelente ou atraente em um conjunto de flores artificiais. Após o condicionamento contextual, 75% das abelhas foram capazes de escolher a flor artificial sem ou com *footprint*, sendo indicador da presença ou aumento da concentração (lucratividade), respectivamente (para mais detalhes veja Capítulo 2). Schorkopf *et al.* (2009) avaliaram o papel de feromônios produzidos pelas glândulas mandibulares de duas

espécies de abelhas sem ferrão: *Trigona spinipes* e *Scaptotrigona* aff. *Depilis*, no processo coordenado de defesa do ninho. Nos experimentos os autores demonstraram que as secreções da glândula mandibular ativam o comportamento agressivo não só entre companheiras de ninho, mas também entre co-específicas de ninhos diferentes, e até mesmo entre abelhas de espécies diferentes. Estas conclusões indicam que as secreções da glândula mandibular contêm feromônios e aloquímicos que podem ser utilizados na comunicação intra- e interespecíficas pelas abelhas sem ferrão (Schorkopf *et al.*, 2009).

O objetivo deste capítulo foi descrever o centro olfatório primário de *Melipona scutellaris* apresentando a primeira reconstrução tri-dimensional do lobo antenal de forrageadora de abelha sem ferrão e, investigar se esta espécie expressa adaptações neuro-anatômicas específicas, que podem ser responsáveis pelo processamento de informações feromonais, relacionadas ao forrageamento e/ou defesa do ninho (feromônio de alarme).

## 3.2. Material e Métodos

### 3.2.1. Procedimentos Neuro-anatômicos

Forrageadoras de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) coletadas com rede entomológica na entrada das colônias, tiveram suas cabeças retiradas com tesoura de dissecação e fixadas em glutaraldeído 4% em solução tampão (PBS) 0.1 M, pH 7.2. Após 5 dias, os cérebros foram delicadamente removidos e enxaguados 3 x 10 min com PBS 0.1 M em um agitador a uma velocidade de 20 rpm em temperatura ambiente). Para corar o material, os cérebros foram imersos em uma solução de *Neutral Red* 4% (Michrome n° 226, Edward Gurr, Ltd., London, United Kingdom) durante 3 horas. Depois, foram novamente enxaguados em 0.1 M PBS, e desidratados em série crescente de etanol (50%, 70%, 90%, 95%, e 3 x 100%, 10 min cada passo). Para clarear a preparação foram armazenados em Metil-salicilato (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) por pelo menos 24 horas.

Os cérebros foram frontalmente orientados e posicionados num orifício central de lâminas especiais feitas de alumínio. Tal orifício era coberto com lamínulas em ambos os lados. Depois de todo procedimento, as preparações foram mantidas à -20°C.

### 3.2.2. Aplicação do Marcador Fluorescente

Para visualizar os *tracti* que inervam os *clusters* de glomérulos, uma abelha foi submetida à marcação retrógrada do lobo antenal via nervo antenal. Para execução da técnica, uma abelha viva foi contida em um tubo de metal e teve sua cabeça e suas antenas imobilizadas com gotas de cera de abelhas melíferas. Em cada antena, no escapo, foi aberta

uma janela na cutícula e, com auxílio de um eletrodo de vidro foram inseridos via nervo antenal cristais de rodamina (tetra-methyl rhodamine dextran - Invitrogen Molecular Probe, Eugene, Oregon, USA). A janela cuticular foi coberta com um gel (quick-seal) que evita o ressecamento da área aberta. A abelha de 10 dias foi mantida viva, em temperatura ambiente, dentro de uma câmara úmida por 24 horas, período suficiente para que o corante migre para dentro do cérebro do animal.

O cérebro foi dissecado em solução Ringer (130 mM NaCl, 6 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 25 mM glucose, 160 mM sucrose, pH 7.2), e imediatamente transferido para uma solução de paraformaldeído 4% em PBS 0.1 M e estocado por 24 horas à 4°C. Depois passou pelo mesmo procedimento já descrito na seção anterior: enxaguado em PBS 0.1 M e desidratado em uma série crescente de etanol, clareado em Metil-salicilato (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) por pelo menos 24 horas.

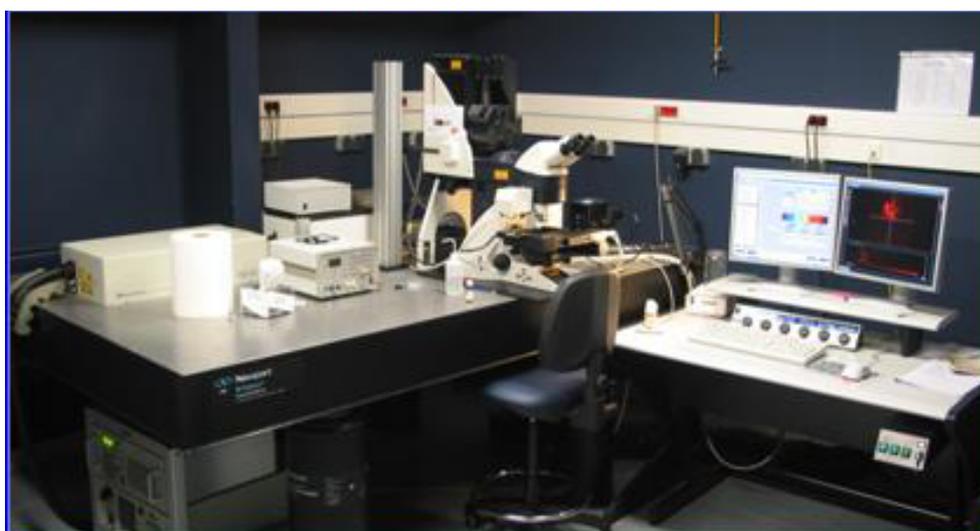
A preparação foi orientada da mesma forma descrita na seção anterior, no centro de lâminas especiais de alumínio e mantida à -20°C.

### **3.2.3. Microscopia Confocal de Escaneamento Laser e Reconstrução Tri-dimensional**

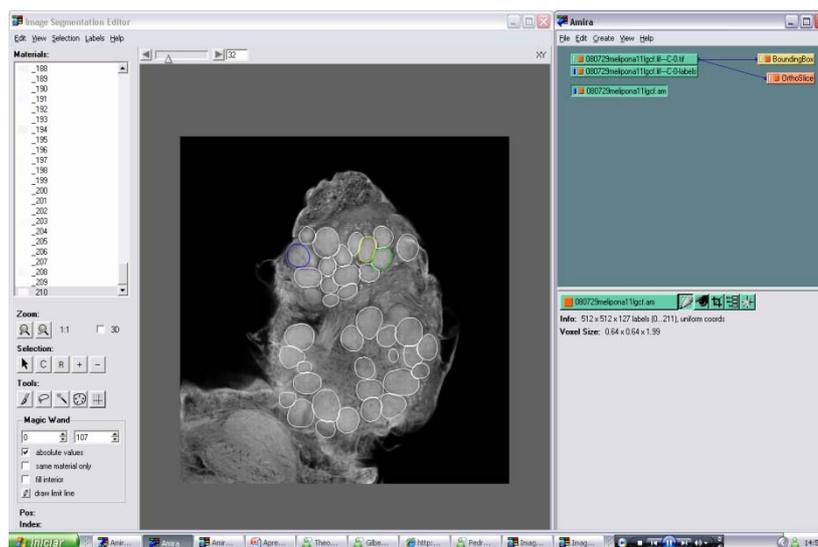
Os lobos antenais foram escaneados com microscópio confocal laser (Leica TCS SP5) (Figura 3.1). Duas lentes objetivas foram usadas, 10 x 0.3 NA fluotar-ON DIC (a seco) para escanear o cérebro todo e 20 x 0.7 NA PL APO-ON DIC (imersão em água) para escanear cada lobo antenal em detalhe. As preparações foram excitadas em comprimento de onda de 561 nm para o corante *Neutral Red* (veja 3.2.1) e também para rodamina (veja 3.2.2). Cada lobo foi escaneado com *stacks* de 2 µm, desde a porção mais dorsal à mais ventral, atingindo toda a profundidade do neurópilo. A qualidade das

imagens foi automaticamente calculada a cada 4 *stacks*, criando uma série de seções óticas de 512 x 512 pixels.

As reconstruções tridimensionais foram realizadas com o software AMIRA (Mercury Computer Systems, Berlin, Germany) (Figura 3.2). Os glomérulos foram individualmente visíveis graças à qualidade das preparações. Cada glomérulo foi redesenhado em três planos (xy, yz, xz) através de uma ferramenta disponível no software AMIRA chamada *wrap*. A identificação do mesmo glomérulo entre os exemplares foi feita com base em características morfológicas como tamanho, forma e posição relativa.



**Figura 3.1.** Microscópio Confocal Laser (Leica TCS SP5). *Plateforme de imagerie - Centre de Biologie du Développement (CBD - IFR109) da Université Paul Sabatier – Toulouse III, Toulouse, França.*



**Figura 3.2.** Software AMIRA 3.0. Logicial cedido pela *Plateforme de imagerie - Centre de Biologie du Développement (CBD - IFR109)* da Université Paul Sabatier – Toulouse III, Toulouse, França.

### 3.2.4. Análise dos Dados

Para investigar a organização neuroanatômica do lobo antenal de *Melipona scutellaris*, o lobo esquerdo e direito de operárias forrageadoras foram escaneados. Sempre posicionados no mesmo eixo, dorsal-ventral e lateral-medial, relativo ao nervo antenal. O número total de glomérulos foi contado e cada um recebeu uma identificação individual. Alguns glomérulos em especial foram usados como satélites para o reconhecimento dos demais, os satélites foram escolhidos com base em sua posição e também por sua excelente condição de marcação pelo corante.

As reconstruções tridimensionais completas dos lobos antenais permitiram estabelecer comparações morfológicas e volumétricas entre os indivíduos e, identificar uma possível estrutura especializada no lobo antenal de operárias, que possa operar na detecção de feromônio durante a atividade de forrageamento ou defesa do ninho. O número

de indivíduos utilizados em cada comparação e demais resultados está descrito na seção Resultados.

### **3.2.5. Análise Estatística**

O *Test-t* foi usado para verificar diferenças entre as quantidades de glomérulos e as medidas de volume.

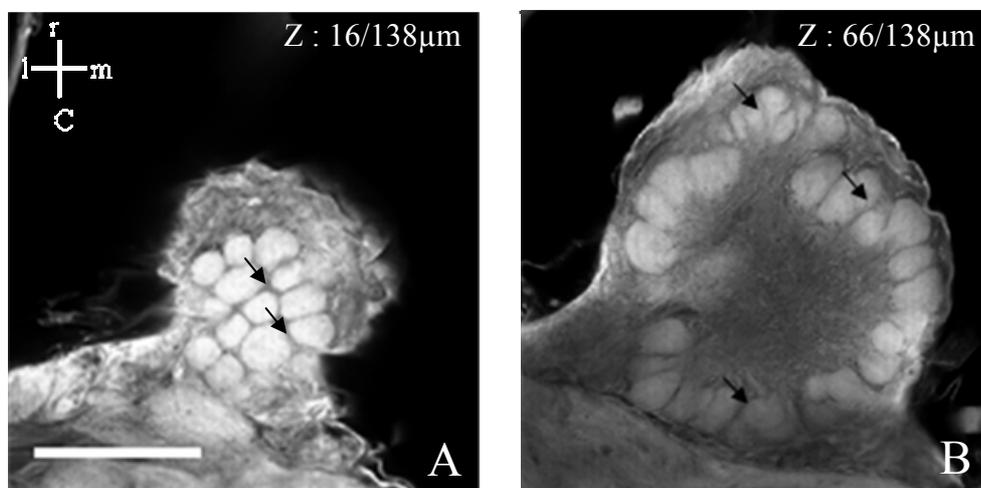
### **Agradecimento**

Agradecemos as facilidades pelo treinamento e utilização do aparelho de Microscopia Confocal Laser (Leica TCS SP5) do *Centre de Biologie du Développement* (CBD - IFR109) da Université Paul Sabatier – Toulouse III, Toulouse, França. E, pelo acesso ao *software* AMIRA 3.0<sup>®</sup> como ferramenta para as reconstruções tridimensionais e análises volumétricas.

Ao Dr. Jean-Christophe Sandoz pelo financiamento do treinamento e pelas horas/utilização disponibilizados de seu projeto junto à *Agence Nationale de La Recherche* (ANR) vinculado ao *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS).

### 3.3. Resultados

As preparações ficaram transparentes o bastante para permitir a visualização dos limites glomerulares (Figura 3.3A). Porém, em algumas posições, os glomérulos são tão próximos uns dos outros que impossibilita a identificação precisa (Figura 3.3B). Provavelmente, esta característica é responsável pela diferença encontrada na contagem do número total de glomérulos entre os indivíduos e entre os lados, esquerdo e direito. Porém não há diferença estatística: *Test-t*,  $P = 0,860$  (Tabela 3.1). A Tabela 3.2 mostra o valor médio do volume total dos lobos esquerdo e direito, *Test-t*,  $P = 0,535$ . Na mesma Tabela ainda, encontramos o maior e o menor volume individual de cada lado, em inspeção visual podemos verificar que se trata dos mesmos glomérulos nos dois casos.



**Figura 3.3.** Imagem do lobo antenal de *Melipona scutellaris* (operária forrageadora – lado esquerdo). (A) A qualidade das preparações permite identificar os limites glomerulares, indicados pelas setas. (B) Em certas posições os glomérulos são muito próximos uns dos outros impossibilitando a identificação exata da quantidade de glomérulos, fato que resultou em variação no número total de glomérulos entre os lobos analisados. As setas indicam glomérulos que estão sobrepostos. Escala em A = 100μm (aplicada em B).

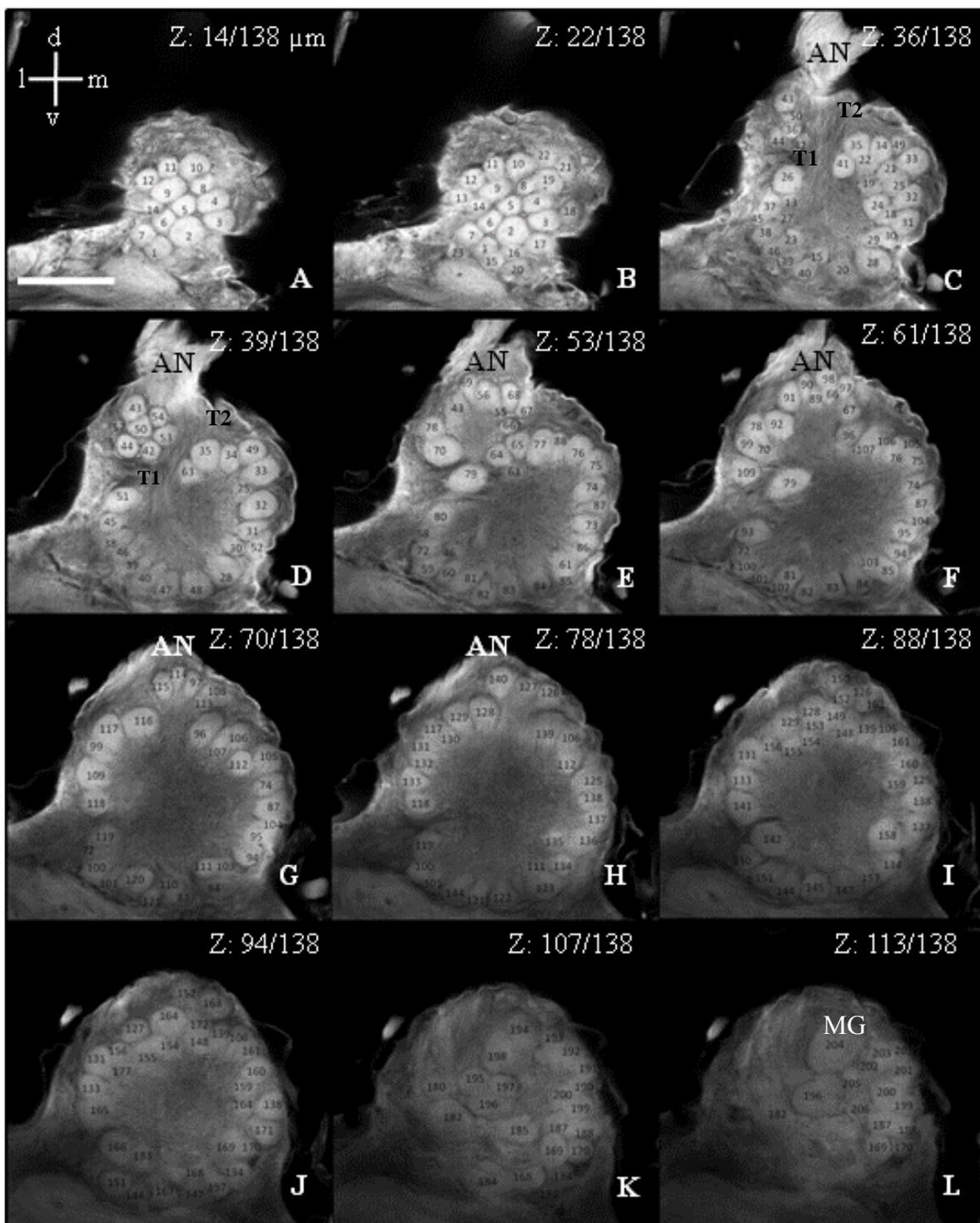
**Tabela 3.1.** Somatório de Glomérulos (média  $\pm$  desvio padrão), Volume Total (média  $\pm$  desvio padrão), Volume Maior e Volume Menor encontrados dos lobos antenais de *Melipona scutellaris* analisados com o suporte do *software* AMIRA 3.0<sup>®</sup>.

	Esquerdo	Direito	<i>Test - t</i>
$\Sigma$	208 $\pm$ 5 (N = 11)	207 $\pm$ 8 (N = 9)	P = 0,860
VT [ $\mu\text{m}^3$ ]	2.766.891,43 $\pm$ 222.815,6 (N = 7)	2.689.528 $\pm$ 230495,4 (N = 7)	P = 0,535
VM <sup>a</sup> [ $\mu\text{m}^3$ ]	104.291	105.634	
VM <sup>b</sup> [ $\mu\text{m}^3$ ]	1.697	890	

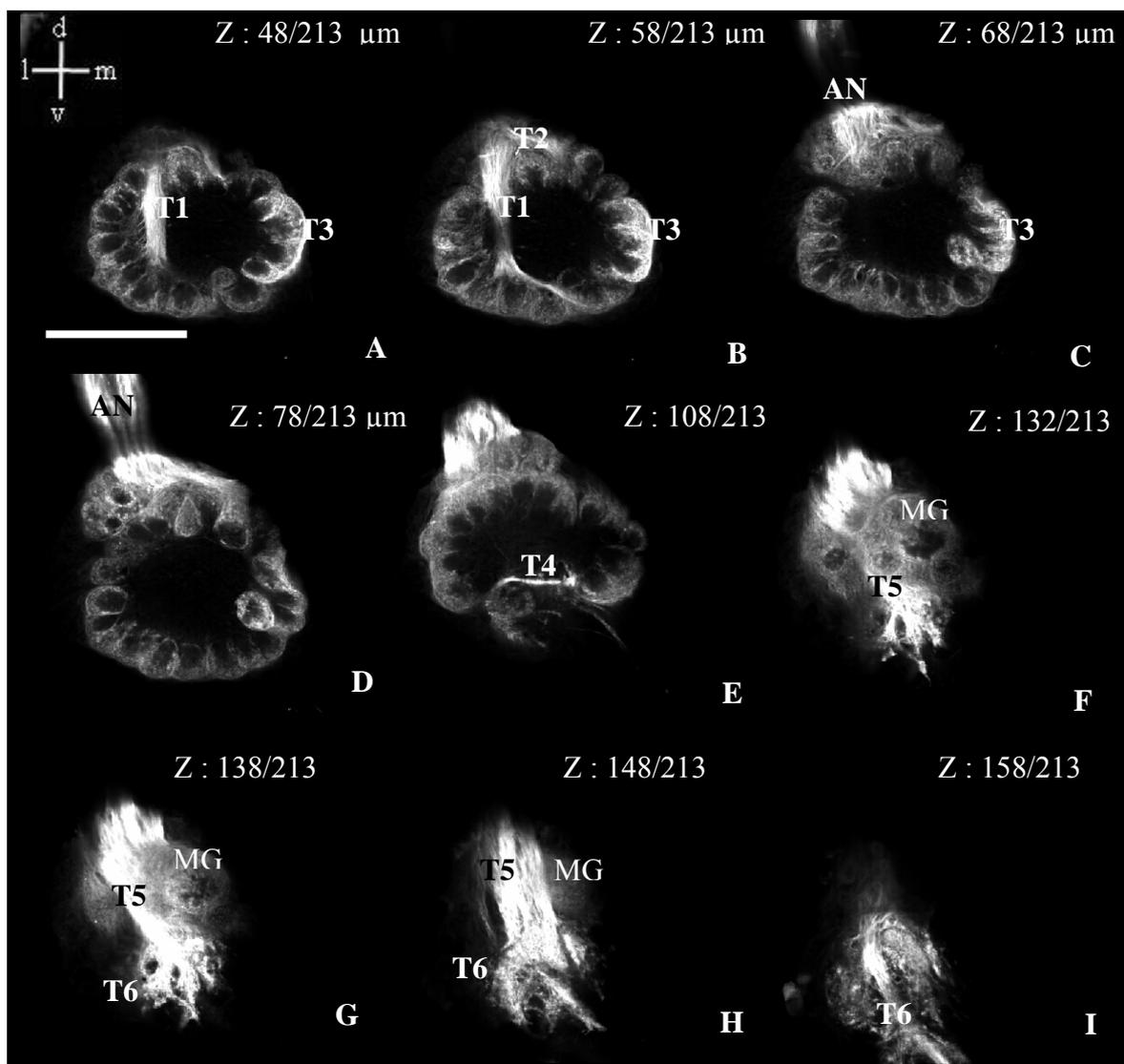
Legenda:  $\Sigma$ : somatório de glomérulos, VT: volume total, VM<sup>a</sup>: volume maior, VM<sup>b</sup>: volume menor.

A seqüência de imagens (Figura 3.4 A – L) composta por 138 *stacks* de 2  $\mu\text{m}$  mostra que os glomérulos estão distribuídos na periferia do neurópilo, este arranjo é semelhante tanto no lobo antenal esquerdo quanto no direito. Na Figura 3.4D notamos 2 hemisférios principais, um dorsal e o outro ventral. Cada glomérulo foi identificado por um número. Os glomérulos que receberam os números menores estão posicionados dorsalmente e, os glomérulos que receberam os números mais altos estão posicionados ventralmente. Além destes dois hemisférios principais, em Figura 3.4 C, D, E, F, G, H, I, podemos observar clusteres, conjuntos de glomérulos inervados por um *tractus* correspondente, originário do nervo antenal. Dois *tracti* principais (T1 e T2) podem ser facilmente notados na Figura 3.4 C e D.

A Figura 3.5 é uma seqüência de imagens para a identificação dos *tracti*. Os respectivos clusteres glomerulares não foram tridimensionalmente reconstruídos devido à qualidade do material histológico que não permitiu a individualização dos glomérulos.



**Figura 3.4.** Sequência de imagens do lobo antenal de forrageadora de *Melipona scutellaris*. Z indica a seção de 2  $\mu\text{m}$  em relação ao total de imagens feitas (138). Os números sobre os glomérulos representam a contagem total e também serviram na identificação. Os números de valores mais baixos são referentes aos glomérulos dorsais e os números maiores aos glomérulos ventrais. Em C e D temos os *tracti* principais, T1 e T2. AN = nervo antenal. MG = macro-glomérulo. Escala em A = 100 $\mu\text{m}$  (aplicada de A a L).



**Figura 3.5.** Sequência de imagens do lobo antenal de forrageadora de *Melipona scutellaris* para identificação dos *tracti* que inervam os clusters glomerulares. Marcação anterógrada com cristais de rodamina. Z indica a seção de 2  $\mu\text{m}$  em relação ao total de imagens feitas (213). T1, T2, T3, T4, T5, T6: tracti identificados provenientes do nervo antenal. AN = nervo antenal. MG = macro-glomérulo. Escala em A = 100 $\mu\text{m}$  (aplicada de A a I).

Categorias de volume foram criadas com intervalos de  $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ , para separar grupos de glomérulos e, identificar a contribuição das categorias no volume total (Tabela 3.2 e 3.3) (Figura 3.6). Através da distribuição dos glomérulos de acordo com seus volumes individuais, identificamos que os glomérulos que compuseram as categorias de volume entre  $6 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  e  $10,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  e,  $11 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  e  $15,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  existem em maior quantidade, correspondendo no primeiro intervalo citado a 35,5% lado esquerdo, e 34,5% lado direito do número total de glomérulos, porém não são a maior contribuição em grupo para o volume total, representam apenas 0,3% e 0,31%, respectivamente, e, 28,4% e 26,4% para o segundo intervalo citado, correspondendo a 0,48% e 0,49% do volume total respectivamente.

Seguindo a distribuição dos glomérulos de acordo com o volume, verificamos forte indício de especialização glomerular. Ao menos  $25 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  a mais, separam os potenciais macro-glomérulos dos demais analisados, sugerindo o primeiro registro de macro-glomérulo no lobo antenal em casta operária dentro da família Apidae.

**Tabela 3.2.** Distribuição glomerular em intervalos de  $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ . Número de glomérulos que compõem cada intervalo (média  $\pm$  desvio padrão). A análise volumétrica dos lobos antenais de *Melipona scutellaris* (forrageadoras) foi analisada com o suporte do *software* AMIRA 3.0<sup>®</sup>. \*valores inteiros. Entre parênteses: porcentagens que os glomérulos destes intervalos contribuem para o número total de glomérulos. Abaixo das linhas tracejadas estão os macro-glomérulos.

Intervalo de Volume	N° de glomérulos (média $\pm$ desvio padrão)	
	Esquerdo	Direito
$< 5,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	25,5 $\pm$ 7,6	29,4 $\pm$ 10,4
$6 \times 10^3 - 10,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	73,5 $\pm$ 5,7 (35,5%)	72,0 $\pm$ 13,2 (34,5%)
$11 \times 10^3 - 15,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	59,2 $\pm$ 6,3 (28,4%)	54,8 $\pm$ 6,7 (26,4%)
$16 \times 10^3 - 20,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	25,1 $\pm$ 5,1	27,8 $\pm$ 4,3
$21 \times 10^3 - 25,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	14,0 $\pm$ 2,7	14,4 $\pm$ 6,9
$26 \times 10^3 - 30,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	6,7 $\pm$ 2,6	5,7 $\pm$ 2,8
$31 \times 10^3 - 35,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	2,4 $\pm$ 1,9	2,1 $\pm$ 1,6
$36 \times 10^3 - 40,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	1,2 $\pm$ 1,7	*4,0
$41 \times 10^3 - 45,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	*2,0	*6,0
$46 \times 10^3 - 50,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	*3,0	0
$51 \times 10^3 - 55,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	*1,0	0
$56 \times 10^3 - 60,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	*3,0	*1,0
$61 \times 10^3 - 65,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	*1,0	0
$66 \times 10^3 - 70,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	*1,0	0
$71 \times 10^3 - 75,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	0	*3,0
$76 \times 10^3 - 80,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	*2,0	*1,0
$81 \times 10^3 - 85,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	*1,0	0
$86 \times 10^3 - 90,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	*1,0	*2,0
$91 \times 10^3 - 95,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	*1,0	0
$96 \times 10^3 - 100,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	*1,0	0
$101 \times 10^3 - 105,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	*1,0	*1,0

**Tabela 3.3.** Distribuição glomerular em intervalos de  $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ . Volume (média  $\pm$  desvio padrão) do grupo de glomérulos que compõem cada categoria. A análise volumétrica dos lobos antenais de *Melipona scutellaris* (forrageadoras) foi analisada com o suporte do *software* AMIRA 3.0<sup>®</sup>. \*valores inteiros. Entre parênteses: porcentagens que os glomérulos destes intervalos contribuem para o volume total. Abaixo das linhas tracejadas estão os volumes dos macro-glomérulos.

Intervalo de Volume	Média de volume (média $\pm$ desvio padrão)	
	Esquerdo	Direito
$< 5,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	4.597,6 $\pm$ 1.072,7	4.498,3 $\pm$ 1.162,0
$6 \times 10^3 - 10,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	8.509,4 $\pm$ 1.405,3 (0,3%)	8.542,9 $\pm$ 1405,4 (0,31%)
$11 \times 10^3 - 15,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	13.142,1 $\pm$ 1.348,8 (0,48%)	13.184,4 $\pm$ 1.423,7 (0,49%)
$16 \times 10^3 - 20,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	18.119,6 $\pm$ 1.461,6	17.919,4 $\pm$ 1.362,5
$21 \times 10^3 - 25,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	23.049,8 $\pm$ 1.438,0	22.644,9 $\pm$ 1.582,6
$26 \times 10^3 - 30,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	27.070,5 $\pm$ 4.286,8	27.839,3 $\pm$ 1.238,7
$31 \times 10^3 - 35,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	33.326,9 $\pm$ 1.464,1	32.485,2 $\pm$ 1.067,3
$36 \times 10^3 - 40,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	37.847,2 $\pm$ 1.415,9	37.151,7 $\pm$ 873,8
$41 \times 10^3 - 45,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	42.148,0 $\pm$ 1.421,2	43.799,1 $\pm$ 1.660,0
$46 \times 10^3 - 50,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	47.237,3 $\pm$ 997,6	0
$51 \times 10^3 - 55,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	52.719,0*	0
$56 \times 10^3 - 60,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	57.800,3 $\pm$ 1.106,9	59.524,0*
$61 \times 10^3 - 65,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	61.932,0*	0
$66 \times 10^3 - 70,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	68.819,0*	0
$71 \times 10^3 - 75,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	0	74.770,5 $\pm$ 3.027,7
$76 \times 10^3 - 80,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	79.035,5 $\pm$ 2.600,0	78.989,0*
$81 \times 10^3 - 85,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	81.650,0*	0
$86 \times 10^3 - 90,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	86.569,0*	87.386,0 $\pm$ 1.501,8
$91 \times 10^3 - 95,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	95.064,0*	0
$96 \times 10^3 - 100,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	97.823,0*	0
$101 \times 10^3 - 105,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$	104.291,0*	105.634,0*

O glomérulo hipertrofiado contribui com mais de 2,5% do volume total (Tabela 3.4 e 3.5). Apresentam-se em média de 9 a 10 vezes maiores que a média de volume dos glomérulos que estão no segundo intervalo da categoria de volume (esquerdo:  $8.509,4 \pm 1.405,3$ ; direito:  $8.542,9 \pm 1405,4$  – Tabela 3.3) e, de 6 a 6,5 vezes maiores que a média de volume dos glomérulos que estão no terceiro intervalo da categoria de volume (esquerdo:  $13.142,1 \pm 1.348,8$ ; direito:  $13.184,4 \pm 1.423,7$  – Tabela 3.3). Importante salientar que o registro do macro-glomérulo foi semelhante em todos os lobos estudados, tanto do lado esquerdo quanto do lado direito (*test-t*,  $P = 0,308$ ), ou seja, não foi observada lateralidade.

Os indícios da existência de um macro-glomérulo são fortemente apoiados pela posição que ocupam, são ventrais, próximo a entrada do nervo antenal, definindo provável funcionalidade específica e, também pelo maior volume individual em relação aos outros glomérulos.

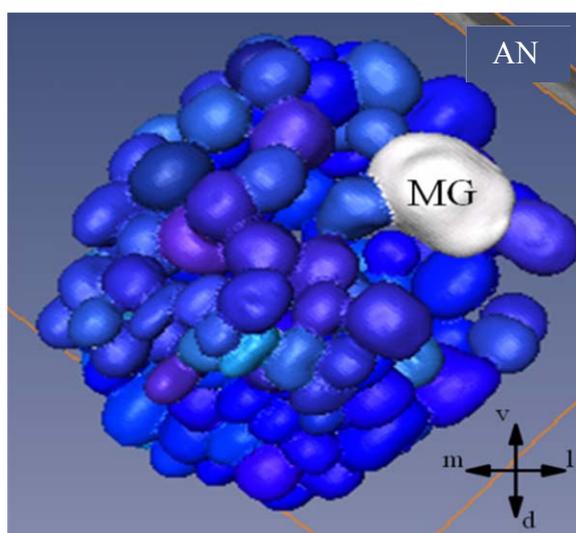
**Tabela 3.4.** Estudo volumétrico dos glomérulos hipertrofiados em operárias forrageadoras de *Melipona scutellaris*. (A) Volume macroglomerular Esquerdo e Direito (N = 7) e a média destes valores.

(A) Lobo Antenal	Esquerdo	Direito	<i>Test-t</i>
1	95.064,0	72.038,0	
2	81.650,0	74.781,0	
3	77.197,0	73.274,0	
4	97.823,0	105.634,0	
5	86.569,0	78.989,0	
6	104.291,0	88.448,0	
7	80.874,0	86.324,0	
Volume de MG [ $\mu\text{m}^3$ ] (média $\pm$ desvio padrão)	$89.066,8 \pm 10.113,3$	$82.784,0 \pm 11.910,0$	$P = 0,308$

**Tabela 3.5.** Contribuição do volume do macro-glomérulo (%) no volume total de cada lobo antenal analisado.

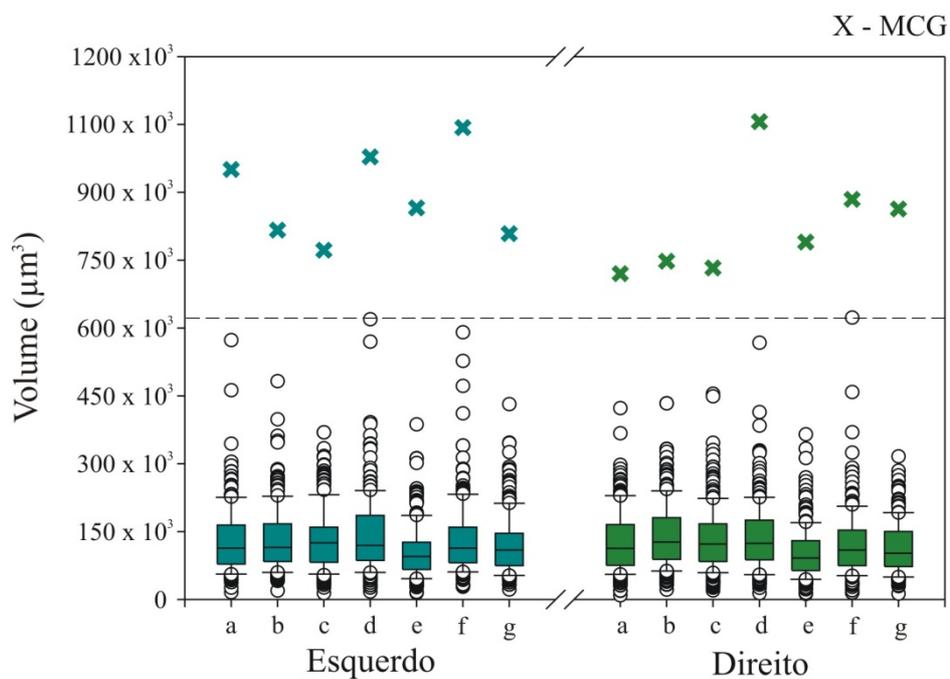
(B) Lobo Antenal	% do volume total		<i>Test-t</i>
1	3,4	2,5	
2	2,8	2,5	
3	2,6	2,5	
4	3,2	3,7	
5	3,7	3,3	
6	3,7	3,5	
7	3,0	3,4	
média ± desvio padrão	3,226 ± 0,427	3,057 ± 0,535	P = 0,627

A Figura 3.6 é uma reconstrução tridimensional de um lobo antenal (esquerdo) de *Melipona scutellaris* realizada com o suporte do software AMIRA<sup>®</sup> 3.0. Em branco, o glomérulo hipertrofiado, a estrutura potencialmente especializada na percepção e processamento de informação olfatória proveniente de feromônio, relacionado à defesa do ninho ou ao forrageamento. Em azul, os demais glomérulos que constituem o centro primário olfatório.



**Figura 3.6.** Reconstrução tridimensional de um lobo antenal de *Melipona scutellaris* (forrageadoras). AN: Nervo Antenal, MG: Provável macro-glomérulo e, em azul os demais glomérulos mapeados.

**Figura 3.7.** Distribuição dos glomérulos relativa ao volume. Os *box plot* representam a grande maioria de glomérulos através do número médio de glomérulos e o desvio padrão. Os círculos vazios são alguns glomérulos que se separam dos demais, e os x representam os macro-glomérulos. A linha tracejada é a metade do volume representado no eixo y. Esquerdo = lobo antenais esquerdos e, Direitos = lobos antenais direitos. Cada letra igual representa um par de lobos, esquerdo e direito, do mesmo cérebro.



### 3.4. Discussão

Nos últimos vinte anos, aprendemos muito sobre a função das antenas enquanto órgãos sensoriais olfatórios nos insetos. Estes estudos expandiram consideravelmente o nosso conhecimento sobre os padrões de excitação enviados a partir de receptores olfatórios para o sistema nervoso central, fornecendo um ponto de partida para a pesquisa da via olfatória no cérebro dos insetos e também, para podermos relacionar características morfológicas do sistema nervoso com o comportamento (Gronenberg & Hölldobler, 1999; Ehmer & Gronenberg, 2004). Estudos que avaliam a relação estrutura-função dos circuitos neuronais contribuem para novas formas de pensar sobre os importantes aspectos do processamento de odor nos insetos (Zube *et al.*, 2008). O lobo antenal destes animais é um excelente modelo para verificar estas relações e fazer descrições anatômicas que auxiliam a compreensão do processo de detecção, processamento e especialização do sentido olfatório.

Uma notável similaridade entre o sistema olfatório de mamíferos e insetos é verificada pela organização glomerular do centro de processamento primário cerebral, o lobo antenal (Galizia *et al.*, 1999). Nas operárias de abelhas melíferas, Joerges *et al.* (1997) e Galizia *et al.* (1997) demonstraram que a atividade glomerular apresenta um padrão específico de excitação com simetria bilateral (Galizia *et al.* 1998). Mas, não se sabe ainda se este padrão é conservado entre os animais, nos proporcionando uma excelente justificativa para o desenvolvimento de trabalhos que objetivam identificar os glomérulos em diferentes insetos e outros organismos. Uma marcante diferença entre as espécies de insetos já estudadas são os números de glomérulos, que na maioria dos exemplos, o número é limitado, não ultrapassando a soma de 100, fato que possibilita a identificação de cada uma dessas estruturas e seu estudo individualizado. Segue alguns exemplos de espécies que tiveram o lobo antenal mapeado e o respectivo número de glomérulos: *Drosophila*: 43

(Stocker *et al.*, 1990), *Manduca sexta*: 63 (Stocker, 1994; Laissue *et al.*, 1999, Rospars & Hildebrand, 2000; Ignell *et al.*, 2005, Huetteroth & Schachtner, 2005;), *Lobesia botrana*: entre 60 e 71 (Masante-Roca *et al.*, 2005), *Agrotis ipsilon*: 66 (Greiner *et al.*, 2004). Entretanto, os insetos sociais da ordem Hymenoptera apresentam maior quantidade de glomérulos, variando de 164 em *Apis mellifera* (Flanagan & Mercer, 1989a; Arnold *et al.*, 1985) até mais de 600 em *Apterostigma cf. mayri* (630) (Kelber *et al.*, 2009). Podemos ainda notar a diferença na quantidade de unidades olfatórias funcionais em outros exemplos: *Atta sexdens*: 178 e *Atta vollenweideri*: 223 (Kleineidam *et al.*, 2005), *Camponotus japonicus*: 438 (Nishikawa *et al.*, 2008), *Camponotus floridanus*: 460 (Arnold *et al.*, 1985; Flanagan & Mercer, 1989; Galizia *et al.*, 1999; Zube *et al.*, 2008), *Cyphomyrmex costatus*: 257, *Sericomyrmex amabilis*: 344, *Trachymyrmex septentrionalis*: 362, *Acromyrmex lundii*: 477 (Kelber *et al.*, 2009). A disponibilidade e a facilidade de acessar tais referências são de suprema importância para estudos comparativos sobre a evolução e o papel funcional do sistema olfatório dos insetos.

Masante-Roca *et al.* (2005) consideram que o número de glomérulos se relaciona mais ao táxon do que com o tamanho do inseto. Em Lepidoptera, por exemplo, o número de glomérulos parece ser constante independente do tamanho da espécie e o mesmo foi verificado em vespas parasitóides (Smid *et al.*, 2003). Existe um conceito chamado de Invariância Glomerular, o qual considera que o número, a posição e o tamanho dos glomérulos são constantes entre os indivíduos da mesma espécie e sexo (Chambille & Rospars, 1981; Rospars, 1983). Nos insetos sociais parece que o alto número de glomérulos se refere à diversa demanda do sistema olfatório, sendo um possível reflexo do alto nível de organização social, baseada no uso de feromônios e outros compostos químicos para a comunicação e o reconhecimento parental (Kelber *et al.*, 2009). Além da quantidade de glomérulos, o tamanho destas unidades também é uma relevante

característica individual, que pode estar relacionada à capacidade de processamento de informações específicas. Arnold *et al.* (1985) e Hansson & Anton (2000) identificaram um glomérulo excepcionalmente grande no lobo antenal no macho das mariposas *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens*, e em consequentes estudos de estimulação neurofisiológica deste glomérulo, confirmaram sua especificidade na detecção e processamento de informação olfatória relacionado ao feromônio sexual produzido pela fêmea das espécies. Esta afinidade entre estrutura e função foi igualmente verificada em machos de *Apis mellifera* (Arnold *et al.*, 1985; Sandoz, 2006).

O que determina o tamanho de um glomérulo é o número de terminações axonais do neurônio de recepção olfatória que cada unidade glomerular apresenta, sendo esta a característica essencial para a inferirmos sobre a presença de um macro-glomérulo. Esta característica particular pode refletir a importância de um odor na ontogenia de uma espécie, como no exemplo do feromônio sexual (Kelber *et al.*, 2009). Mensuramos o tamanho de um glomérulo através de ferramentas de *softwares* especializados, que nos fornecem medidas em uma dimensão ( $\mu\text{m}$ ) (ImageJ<sup>®</sup>) ou tridimensionais (AMIRA<sup>®</sup>) como o volume do glomérulo ( $\mu\text{m}^3$ ). No caso da possibilidade de existir um macro-glomérulo ou um complexo macroglomerular, uma valiosa informação que contribui para a inferência é o volume destas estruturas em relação ao volume dos outros glomérulos do mesmo lobo, por exemplo, em Attini, Kelber *et al.* (2009) avaliou um possível macro-glomérulo com volume maior que os demais, na escala de 10 a 14 vezes. Em *Melipona scutellaris* quando observamos a distribuição dos volumes glomerulares em intervalos de  $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  observamos que a unidade glomerular indicada como macro-glomérulo está separada da maioria por pelo menos  $25 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ , sendo de 9 a 10 vezes maior que a média de volume dos glomérulos do segundo intervalo de volume e, de 6 a 6,5 vezes maior que os

glomérulos do terceiro intervalo de volume, ambos os intervalos compreendem a maioria dos glomérulos.

A especificidade de odor que um glomérulo é capaz de processar é determinada também pelo neurônio de recepção olfatória (Hansson & Anton, 2000), ou seja, para cada glomérulo existe um tipo de neurônio de recepção olfatória. Outra característica citada nos trabalhos da área sobre a existência de um macro-glomérulo é a posição que ocupa no neurópilo. A proximidade da entrada do nervo antenal parece ser a mais comum: *Lobesia botrana* (Masante-Roca *et al.*, 2005), *Atta sexdens* e *Atta vollenweideri* (Kleineidam *et al.*, 2005), *Camponotus floridanus* (Nishikawa *et al.*, 2008; Zube *et al.*, 2008). Não diferente neste trabalho, o eleito macro-glomérulo é posicionado ventralmente, e ao lado da entrada no nervo antenal, aparentemente, innervado pelo tractus T5 (Figura 3.5 F, G, H).

Contudo, a expansão deste tipo de trabalho para vários Hymenoptera sociais veio a acrescentar informações relevantes sobre o peculiar sistema olfatório dos insetos desta ordem. Recentemente, foi descrita a presença de um macro-glomérulo em operárias de formigas cortadeiras *Atta vollenweideri* e *Atta sexdens*, os resultados dos testes fisiológicos preliminares sugerem que esta estrutura está relacionada à informação olfatória proveniente do feromônio de trilha, sendo, portanto, um registro de macro-glomérulo em casta não reprodutiva (Kleineidam *et al.*, 2005). Somando a estas informações os resultados deste capítulo apresentam o primeiro registro de um macro-glomérulo em casta não reprodutiva em Apidae. A reconstrução do lobo antenal de *Melipona scutellaris* serviu como uma ferramenta para identificar uma possível especialização ao nível do sistema olfatório primário, seguindo a premissa de informações comportamentais relacionadas à sua capacidade de detecção e processamento de odores específicos, principalmente relacionados com estratégias de forrageamento e com a defesa do ninho. O glomérulo hipertrofiado identificado pode revelar uma relação entre estrutura e função para estes

comportamentos. Para abordar a funcionalidade olfatória destes glomérulos, além da identificação, são necessários estudos eletrofisiológicos, que farão parte de um projeto futuro para realização em cooperação com a França, através da já estabelecida parceria com o Dr. Martin Giurfa e Dr. Jean-Christophe Sandoz.

### 3.5. Conclusões

- O lobo antenal de *Melipona scutellaris* apresenta com a distribuição glomerular semelhante ao lobo antenal de *Apis mellifera*, porém com maior quantidade de glomérulos e também com um glomérulo diferenciado dos demais.
- Este glomérulo diferenciado é um forte indício de especialização na detecção e processamento de odores específicos como feromônios.

## Referências Bibliográficas

- Abel R, Rybak J & Menzel R. 2001. Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol* 437: 363–383.
- Abramson CI, Aquino IS & Stone SM. 1999. Failure to find proboscis conditioning in one-day old africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) and in adult urucu honey bees (*Melipona scutellaris*). *International Journal of Comparative Psychology* 12(4): 242-262.
- Aguilar I, Fonseca A & Biesmeijer JC. 2005. Recruitment and communication of food source location in three species of stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Apidologie* 36: 313–324.
- Anton S & Homberg U. 1999. Antennal lobe structure. In: Hansson BS (ed) *Insect olfaction*. Springer, Berlin Heidelberg New York. 97–124 pp.
- Araújo ED, Costa M, Chaud-Netto J & Fowler HG. 2004. Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): Inference of flight range and possible ecological implications. *Braz J Biol* 64: 563-568.
- Arnold G, Masson C & Budharugsa S. 1985. Comparative study of the antennal lobes and their afferent pathways in the worker bee and the drone (*Apis mellifera*). *Cell Tissue Res* 242: 593–605.
- Barth FG, Hrncir M & Jarau S. 2008. Signals and cues in the recruitment behavior of stingless bees (Meliponini). *J Comp Physiol A* 194: 313–27.
- Baumann PM, Oland LA & Tolbert LP. 1996. Glial cells stabilize axonal protoglomeruli in the developing olfactory lobe of the moth *Manduca sexta*. *J Comp Neurol* 373: 118–128.

- Benard J, Stach S & Giurfa M. 2006. Categorization of visual stimuli in the honeybee *Apis mellifera*. *Anim Cogn* 9: 257–270.
- Bego LR. 1983. On some aspects of bionomics in *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Rev Bras Entomol.* 27: 211-224.
- Ben-Sahar Y, Robichon A, Sokolowski MB & Robinson GE. 2002. Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science* 296: 741–744.
- Berg BG, Galizia CG, Brandt R & Mustaparta H. 2002. Digital atlases of the antennal lobe in two species of tobacco budworm moths, *Helicoverpa assulta* (male) and the American *Heliothis virescens* (male and female). *J Comp Neurol* 446: 123–134.
- Bezerra EL & Machado IC. 2003. Biologia floral e sistema de polinização de *Solanum stramonifolium* Jacq. (Solanácea) em remanescente de Mata Atlântica, Pernambuco. *Acta bot brás* 17(2): 247-257.
- Bhagavan S, Benatar S, Cobey S & Smith BH. 1994. Effect of genotype but not of age or caste on olfactory learning performance in the honey bee, *Apis mellifera*. *Anim Behav* 48: 1357-1369.
- Biesmeijer JC & Slaa EJ. 2004. Information flow and organization of stingless bee foraging. *Apidologie* 35: 143–157.
- Blom J van der. 1993. Individual differentiation in behavior of honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Insectes Soc* 40: 345–361.
- Bonabeau E, Theraulaz G & Deneubourg JL. 1996. Quantitative study of the fixed threshold model for the regulation of division of labour in insect societies, *Proc. R. Soc. London B* 263: 1565–1569.
- Bonabeau E. 1998. Social insect colonies as complex adaptive systems. *Ecosystems* 1: 437–443.

- Bonod I, Sandoz JC, Loublier Y & Pham-Delègue M. 2003. Learning and discrimination of odours by the honey bee. *Apidologie* 34: 147-159.
- Breed MD, Michener CD & Evans HE. Orgs. 1982. The biology of social insects. In: Proceedings of the ninth Congress of the International Union for the Study of Social Insects. Westview Press. Boulder, Colorado. 420p.
- Buchmann SL, Jones CE & Colin LJ. 1977. Vibratile pollination of *Solanum douglasii* and *Solanun xantii* (Solanaceae) in Southern California. *The Wasman Journal Biology* 35: 1-25.
- Cameron SA. 1981. Chemical signals in bumble bee foraging. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 9: 257–260.
- Camillo-Atique C. 1977. Estudo da variabilidade etológica de *Friesella* incluindo a caracterização de espécies crípticas (Hymenoptera, Meliponinae). Tese de doutorado, USP, Ribeirão Preto. 203p.
- Châline N, Sandoz JC, Martin SJ, Ratnieks FL & Jones GR. 2005. Learning and discrimination of individual cuticular hydrocarbons by honeybees (*Apis mellifera*). *Chem Senses* 30: 327–335.
- Chambille I & Rospars JP. 1981. Le deutocerebrun de la blatte *Blaberus craniifer* Burm. (Dictyoptera: Blaberidae). Etude qualitative et identification visuelle de glomérules. *Int J Insect Morphol Embryol* 10: 141–165.
- Chittka L. 1998. Sensorimotor learning in bumblebees: long-term retention and reversal training. *J Exp Biol* 201: 515-524.
- Chittka L, Thomson JD & Waser NM. 1999. Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften* 86: 361–377.
- Chittka L. 2002. Influence of intermittent rewards in learning to handle flowers in bumblebees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus impatiens*). *Entomol Gener* 26: 85-91.

- Collett TS & Collett M. 2002. Memory use in insect visual navigation. *Nat Rev Neurosci* 3: 542-552.
- Cook SM, Sandoz JC, Martin AP, Murray DA, Poppy GM & Williams IH. 2005. Could learning of pollen odours by honey bees (*Apis mellifera*) Play a Role in their Foraging Behaviour? *Physiological Entomology* 30: 164-174.
- Corbet SA, Kerslake CJC, Brown D & Morland NE. 1984. Can bees select nectar-rich flowers in a patch. *Journal of Apicultural Research* 23: 234-242.
- Cuthill IC, Kacelnik A, Krebs JR, Haccou P & Iwasa Y. 1990. Starlings exploiting patches: the effect of recent experience on foraging decisions. *Anim Behav* 40: 625-640.
- Dacher M, Lagarrigue A & Gauthier M. 2005. Antennal tactile learning in the honeybee: effect of nicotinic antagonists on memory dynamics. *Neuroscience* 130: 37-50.
- Daly KC, Christensen TA, Lei H, Smith BH & Hildebrand JG. 2004. Learning modulates the ensemble representations for odors in primary olfactory networks. *PNAS* 101(28): 10476-10481.
- Davis RL. 2004. Olfactory learning. *Neuron* 44: 31-48.
- Detrain C & Deneuboug JL. 2009. Social cues and adaptive foraging strategies in ants. In Jarau S, Hrnecir M (eds.) *Food Exploitation by Social Insects: Ecological, Behavioral, and Theoretical Approaches*. Boca Raton: CRC Press. 29-51 pp.
- Dukas R & Real LA. 1993. Learning constraints and floral choice behavior in bumble bees. *Anim Behav* 46: 637-644.
- Dukas R. 2004. Evolutionary biology of animal cognition. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35: 347-74.

- Ehmer B & Gronenberg W. 2004. Mushroom body volumes and visual interneurons in ants: comparison between sexes and castes. *J Comp Neurol* 469: 198–213.
- Farber T, Joerges J & Menzel R. 1999. Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nature Neuroscience* 2: 74-78.
- Farina W, Gruter C, Acosta L & Mc Cabe S. 2006. Honeybees learn floral odors while receiving nectar from foragers within the hive. *Naturwissenschaften* 94: 55–60.
- Farina WM & Grüter C. 2009. Trophallaxis: a mechanism of information transfer. In: *Food Exploitation by Social Insects: Ecological, Behavioral, and Theoretical Approaches* (ed. Jarau, S. and Hrncir M.). Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group. 173–187 pp.
- Ferguson AW & Free JB. 1979. Production of forage- marking pheromone by the honeybee. *Journal of Apicultural Research* 18: 128–135.
- Flanagan D & Mercer AR. 1989. An atlas and 3-d reconstruction of the antennal lobes in the worker bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 18: 145–159.
- Free, J.B. & Williams, I.H. 1983. Scent-marking of flowers by honeybees. *Journal of Apicultural Research* 18: 128–135.
- Free JB. 1987. *Pheromones of Social Bees*. Ithaca, NY, Comstock.
- Freeman WJ. 1999. Olfactory system: odorant detection and classification, In: D. Amit and G. Parisi (Eds.). *Building blocks for Intelligent Systems: Brain components as Elements of Intelligent Function*, vol. III, part 2, Academic Press, New York.
- Frisch, K. v. 1962. Erinnerungen eines Biologen. *Experientia* 18: 49–53.
- Frisch Kv. 1967. *The dance language and orientation of bees*. Belknap Press, Cambridge.

- Fujiwara-Tsujii N, Yamagata N, Takeda T, Mizunami M & Yamaoka R. 2006. Behavioral responses to the alarm pheromone of the ant *Camponotus obscuripes* (Hymenoptera: Formicidae). *Zoological Science* 23: 353-358.
- Fülöp A & Menzel R. 2000. Risk-indifferent foraging behaviour in honeybees. *Anim Behav* 60: 657-666.
- Galizia CG, Joerges J, Kuettner A, Faber T & Menzel R. 1997. A semi-in-vivo preparation for optical recording of the insect brain. *J Neurosci Methods* 76: 61-69.
- Galizia CG, Nägler K, Hölldobler B & Menzel R. 1998. Odour coding is bilaterally symmetrical in the antennal lobes of honeybees (*Apis mellifera*). *Eur J Neurosci* 10: 2964-2974.
- Galizia CG, McIlwrath SL & Menzel R. 1999. A digital threedimensional atlas of the honeybee antennal lobe based on optical sections acquired by confocal microscopy. *Cell Tissue Res* 295: 383-394.
- Galizia CG & Menzel R. 2000. Odour perception in honeybees: coding information in glomerular patterns. *Curr Opin Neurobiol* 10: 504-510.
- Galizia CG & Menzel R. 2001. The role of glomeruli in the neural representation of odours: results from optical recording studies. *J Insect Physiol* 47: 115-130.
- Garcia J & Garcia y Robertson R. 1984. The evolution of learning mechanisms. In: *Annual Meeting of the American Psychological Association*. Toronto. Ontario. 92: 24-28.
- Gerber B, Geberzahn N, Hellstern F, Klein J & Kowalksy O. 1996. Honey bees transfer olfactory memories established during flower visits to a proboscis extension paradigm in the laboratory. *Anim Behav* 52: 1079-1085.
- Giannini KM. 1997. Division labor in *Melipona compressipes fasciculata* Smith (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *An Soc Entomol Brasil* 26(1): 153-162.

- Giraldeau LA. 1997. The ecology of information use. In: Behavioural Ecology. 4th edn (Ed. by J. R. Krebs & N. B. Davies). Oxford: Blackwell. 42–68 pp
- Giurfa M & Nuñez JA. 1992. Honeybees mark with scent and reject recently visited flowers. *Oecologia* 89: 113–117.
- Giurfa M. 1993. The repellent scent-mark of the honeybee *Apis mellifera ligustica* and its role as communication cue during foraging. *Insectes Soc* 40: 59–67.
- Giurfa M. 2003. The amazing mini-brain: lessons from a honey bee. *Bee World* 84(1): 5–18.
- Giurfa M & Malun D. 2004. Associative mechanosensory conditioning of the proboscis extension reflex in honeybees. *Learn Mem* 11: 294-302.
- Giurfa M. 2005. Centro de estudos do Instituto Osvaldo Cruz. Encontro semanal com a ciência.2005.[http://www.ioc.fiocruz.br/centrodestudos/corpo/noticias/noticias\\_arq25\\_07.htm](http://www.ioc.fiocruz.br/centrodestudos/corpo/noticias/noticias_arq25_07.htm). Acessado em 17/07/2007.
- Giurfa M. 2007. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *J Comp Physiol A* 193: 801-824.
- Goulson D, Hawson SA, Stout JC. 1998. Foraging bumblebees avoid flowers already visited by conspecifics or by other bumblebee species. *Anim Behav* 55: 199–206.
- Goulson D, Chapman JW & Hughes WOH. 2001. Discrimination of unrewarding flowers by bees; direct detection of rewards and use of repellent scent marks, *J Insect Behav* 14: 669–678.
- Greiner B, Gadenne C & Anton S. 2004. Three-dimensional antennal lobe atlas of the male moth, *Agrotis ipsilon*: a tool to study structure-function correlation. *J Comp Neurol* 475: 202–210.

- Gronenberg W & Hölldobler B. 1999. Morphologic representation of visual and antennal information in the ant brain. *J Comp Neurol.* 412: 229–240.
- Grosso AF & Bego LR. 2002. Division labor, average life span, survival curve, and nest architecture of *Tetragonisca angustula angustula* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Sociobiology* 40: 615-637.
- Guerrierri F, Schubert M, Sandoz JC & Giurfa M. 2005. Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PloS Biology* 3(4): 718-732.
- Hammer M & Menzel R. 1995. Learning and memory in the honeybee. *The Journal of Neuroscience* 15(35): 1617-1630.
- Hammer M & Menzel R. 1998. Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. In *Learning & Memory*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 5: 146-156.
- Hansson BS & Anton S. 2000. Function and morphology of the antennal lobe: new developments. *Ann Rev Entomol* 45: 203– 231.
- Hildebrand JG. 1996. Olfactory control of behavior in moths: central processing of odor information and the functional significance of olfactory glomeruli. *J Comp Physiol A* 178: 5–19.
- Hildebrand JG & Shepherd GM. 1997. Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Ann Rev Neurosci* 20: 595–631.
- Hildebrandt H & Müller U. 1995. Octopamine mediates rapid stimulation of PKA in the antennal lobe of honeybees. *J Neurobiol* 27: 44–50.
- Homberg U, Montague RA & Hildebrand JG. 1988. Anatomy of antenno-cerebral pathways in the brain of the sphinx moth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res* 254: 255–281.

- Hosler JS & Smith BH. 2000. Blocking and the detection of odor components in blends. *The Journal of Experimental Biology* 203: 2797-2806.
- Hrncir M, Jarau S, Zucchi R & Barth FG. 2004 a. On the origin and properties of scent marks deposited at the food source by a stingless bee, *Melipona seminigra* FRIESE 1903. *Apidologie* 35: 3-13.
- Hrncir M. 2009. Mobilizing the foraging force - Mechanical signals in stingless bee recruitment. In: *Food Exploitation by Social Insects: Ecological, Behavioral, and Theoretical Approaches* (ed. Jarau, S. and Hrncir M.). Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group. 199 – 221 pp.
- Huetteroth W & Schachtner J. 2005. Standard three-dimensional glomeruli of the *Manduca sexta* antennal lobe: a tool to study both developmental and adult neuronal plasticity. *Cell Tissue Res* 319: 513–524.
- Ignell R, Dekker T, Ghaninia M & Hansson BS. 2005. Neuronal architecture of the mosquito deutocerebrum. *J Comp Neurol* 493: 207– 240.
- Imperatriz-Fonseca VL. 1998. O apicultor e a conservação de abelhas sem ferrão. In: XII Congresso Brasileiro de Apicultura (Anais). Salvador: CBA/FAABA. 270 p.
- Inoue T, Salmah S & Sakagami SF. 1996. Individual variations in worker polyethism of the Sumatran stingless bee *Trigona (Tetragonula) minangkabau* (Apidae, Meliponinae). *Jpn J Ent* 64(3): 641–668.
- Jarau E, Hrncir M, Zucchi R & Barth FG. 2000. Recruitment behavior in stingless bees, *Melipona scutellaris* and *Melipona quadrifasciata*. I. Foraging at food Sources differing in direction and distance. *Apidologie* 31: 81-91.
- Jarau S, Hrncir M, Schmidt VM, Zucchi R & Barth FG. 2003. Effectiveness of recruitment behavior in stingless bees (Apidae, Meliponini) *Insect Soc* 50: 365–374.

- Jarau S, Hrncir M, Ayasse M, Schulz C, Francke W, Zucchi R & Barth FG. 2004 a. A stingless bee (*Melipona seminigra*) marks food sources with a pheromone from its claw retractor tendons. *J Chem Ecol* 30: 793-804.
- Jarau S, Hrncir M, Zucchi R & Barth FG. 2004 b. A stingless bee uses labial gland secretions for scent trail communication (*Trigona recursa* Smith 1863). *J Comp Physiol A* 190: 233–239.
- Jarau S, Schulz CM, Hrncir M, Francke W, Zucchi R, Barth FG & Ayasse M. 2006. Hexyl decanoate, the first trail pheromone compound identified in a stingless bee, *Trigona recursa*. *J Chem Ecol* 32: 1555–1564.
- Jarau S. 2009. Chemical communication during food exploitation in stingless bees. In Jarau S, Hrncir M (eds.) *Food Exploitation by Social Insects: Ecological, Behavioral, and Theoretical Approaches*. Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group. 223-249 pp.
- Jarau S & Hrncir M. 2009. Introduction. In: *Food Exploitation by Social Insects: Ecological, Behavioral, and Theoretical Approaches* (ed. Jarau, S. and Hrncir M.). Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group. 1 – 5 pp.
- Joerges J, Küttner A, Galizia GC & Menzel R. 1997. Representation of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature* 387: 285–288.
- Kacelnik A & Krebs JR. 1985. Learning to exploit patchily distributed food. In: Silby RM, Smith R (eds.) *Behavioural Ecology*. Oxford University Press, Oxford. 189-205 pp.
- Kanzaki R, Arbas EA, Strausfeld NJ & Hildebrand JG. 1989. Physiology and morphology of projection neurons in the antennal lobe of the male moth *Manduca sexta*. *J Comp Physiol* 165: 427-453.
- Kanzaki R, Soo K, Seki Y & Wada S. 2003. Projections to higher olfactory centers from subdivisions of the antennal lobe macroglomerular complex of the male silkworm. *Chem Sense* 28: 113–130.

- Kato M. 1988. Bumblebee visits to *Impatiens* spp.: Pattern and efficiency. *Oecologia* 76: 364–370.
- Kelber C, Rössler W, Roces F & Kleineidam CJ. 2009. The antennal lobes of fungus-growing ants (Attini): neuroanatomical traits and evolutionary trends. *Brain Behav Evol* 73: 273–284.
- Kerr WE, Carvalho GA & Nascimento VA. 1996. Abelha urucu – Biologia, manejo e conservação. Fundação Acangaú. Belo Horizonte. 144p.
- Kirschner S, Kleineidam CJ, Zube C, Rybak J, Grünewald B & Rössler W. 2006. Dual olfactory pathway in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol* 499: 933–952.
- Kleineidam CJ, Obermayer M, Halbich W & Rössler W. 2005. A macro-glomerulus in the antennal lobe of leaf-cutting ant workers and its possible functional significance. *Chem Senses* 30: 383–392.
- Kunze G. 1933. Einige Versuche über den Geschmackssinn der Honigbiene, *Zool. Jahrb. Abt. Allg. Zool Physiol Tiere* 52: 465–512.
- Laloi D, Roger B, Blight MM, Wadhams JL & Pham-Delègue M. 1999 a. Individual learning ability and complex odor recognition in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Journal of Insect Behavior* 12(5): 585-597.
- Laloi D, Sandoz JC, Picard-Nizou AL, Marchesi A, Pouvreau A, Taséi JN, Poppy G & Pham-Delègue MH. 1999 b. Olfactory conditioning of the proboscis extension in bumble bees. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 90: 123-129.
- Laloi D, Gallois M, Roger B & Pham-Delègue MH. 2001. Changes with age in olfactory conditioning performance of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 32: 231-242.

- Laissue PP, Reiter C, Hiesinger PR, Halter S, Fischbach KF & Stocker RF. 1999. Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 405: 543–552.
- Le Conte Y & Hefetz A. 2008. Primer pheromones in social Hymenoptera. *Annu Rev Entomol* 53: 523–42.
- Lichtenberg EM, Hrnčir M & Nieh JC. 2009. A scientific note: foragers deposit attractive scent marks in a stingless bee that does not communicate food location. *Apidologie* 40: 1-2.
- Lindauer M. 1956. Über die Verständigung bei indischen Bienen. *Z vergl Physiol* 38: 521–57.
- Lindauer M & Kerr WE. 1960. Communication between the workers of stingless bees. *Bee World* 41: 29–41.
- Malun D, Waldow U, Kraus D & Boeckh J. 1993. Connections between the deutocerebrum and the protocerebrum, and neuroanatomy of several classes of deutocerebral projection neurons in the brain of male *periplaneta-americana*. *J Comp Neurol* 329: 143–162.
- Martin J & Jessell T. 1995. The sensory systems. In: *Essentials of Neural Science and Behavior* (Chapter 20). Eds: Kandel, E.R. & Schwartz, J.H. Stamford (Conn.): McGraw-Hill/Appleton Lange. 369-385 pp.
- Marshall J. 1935. On the sensitivity of the chemoreceptors on the antenna and fore-tarsus of the honey-bee, *Apis mellifica* L., *J Exp Biol* 12: 17–26.
- Masante-Roca I, Gadenne C & Anton S. 2005. Three-dimensional antennal lobe atlas of male and female moths, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) and glomerular representation of plant volatiles in females. *The Journal of Experimental Biology* 208: 1147-1159.

- McCabe S, Hartfelder K, Santana WC & Farina WM. 2007. Classical conditioning in neotropical bees odor discrimination in classical conditioning of proboscis extension in two stingless bee species in comparison to africanized honeybees. *J Comp Physiol A* 193: 1089–1099.
- McNamara JM, Houston AI & Weisser WW. 1993. Combining prey choice and patch use - what does rate-maximizing predict? *J Theor Biol* 164: 219-238.
- Menzel R. 1990. Learning, memory, and “cognition” in honey bees. In: *Neurobiology of Comparative Cognition*. (eds) Kesner RP & Olten DS. Hillsdale, New Jersey, Lawrence Erlbaum. 237–292 pp.
- Menzel R, Greggers U & Hammer M. 1993. Functional organization of appetitive learning and memory in a generalist pollinator, the honey bee. In Papaj, D; Lewis, A C (eds) *Insect learning: ecological and evolutionary perspectives*. Chapman & Hall; New York, USA. 79–125 pp.
- Menzel R & Miiller U. 1996. Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu Rev Neurosci* 19: 379-404.
- Menzel R. 1999. Memory dynamics in the honeybee. *J Comp Physiol A* 185: 323–340.
- Menzel R. 2001. Behavioral and neural mechanisms of learning and memory as determinants of flower constancy. In: Chittka L, Thomson JD (eds.) *Cognitive Ecology of Pollination*. Cambridge University Press, Cambridge. 21-40 pp.
- Menzel R, Manz G, Menzel R & Greggers U. 2001. Massed and spaced learning in honeybees: the role of CS, US, the intertrial interval, and the test interval. *Learn Mem* 8: 198–208
- Merkle D & Middendorf M. 2004. Dynamic polyethism and competition for tasks in threshold reinforcement models of social insects. *Adaptative Behavior* 12(3–4): 251–262.

- Mery F, Kawecki TJ. 2004. An operating cost of learning in *Drosophila melanogaster*. *Anim Behav* 68: 589-598.
- Mery F, Kawecki TJ. 2005. A cost of long-term memory in *Drosophila*. *Science* 308: 1148
- Michener CD. 1962. An interesting method of pollen collecting by bees from flowers with tubular anthers. *Revista de Biologia Tropical* 10: 167-175.
- Michener CD. 1974. The social behavior of the bees. A comparative Study. Harvard Univ. Press. Cambridge, Massachusetts. 404 p.
- Michener CD. 1979. Biogeography of the bees. *Ann Mo Bot Gard* 66: 277-347.
- Michener CD. 2000. The bees of the world. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press.
- Müller D, Gerber B, Hellstern F, Hammer M & Menzel R. 2000. Sensory preconditioning in honeybees. *The Journal of Experimental Biology* 203: 1351-1364.
- Müller U. 1997. Neuronal cAMP-dependent protein kinase type II is concentrated in mushroom bodies of *Drosophila melanogaster* and the honeybee *Apis mellifera*. *J Neurobiol* 33: 33-44.
- Müller U. 2002. Learning in honeybees: from molecules to behavior. *Zoology* 105: 313-320.
- Nieh JC. 1998. The role of a scent beacon in the communication of food location in the stingless bee, *Melipona panamica*. *Behav Ecol Sociobiol* 43: 47-58.
- Nieh JC, Ramírez S & Nogueira-Neto P. 2003. Multi-source odor-marking of food by a stingless bee, *Melipona mandacaia*, *Behav Ecol Sociobiol* 54: 578-586.
- Nieh JC. 2004 Recruitment communication in stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Apidologie* 35: 159-182.

- Nieh JC, Barreto LS, Contrera FAL & Imperatriz-Fonseca VL. 2004. Olfactory eavesdropping by a competitively foraging stingless bee, *Trigona spinipes*. Proc R Soc Lond B 271: 1633–1640.
- Nishikawa M, Nishino H, Misaka Y, Kubota M, Tsuji E, Satoji Y, Ozaki M & Yokohari F. 2008. Sexual dimorphism in the antennal lobe of the ant *Camponotus japonicus*. Zoological Science 25: 195–204.
- Núñez JA. 1967. Sammelbienen markieren versiegte Futterquellen durch Duft. Naturwissenschaften 54: 322–323.
- Page RE, Erber J & Fondrk MK. 1998. The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). J Comp Physiol A 182: 489–500.
- Pankiw T & Page RE. 1999. The effect of genotype, age, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). J Comp Physiol 185: 207-213.
- Pankiw T, Mindy N, Page RE & Fondrk KM. 2003. The communal crop: modulation of sucrose response thresholds of pre-foraging honey bees with incoming nectar quality. Behav Ecol Sociobiol 55: 286-292.
- Pasteels JM, Bordereau C. 1998. Releaser pheromones in termites. In: Vander Meer RK, Breed MD, Espelie KE, Winston ML (eds.) Pheromone Communication in Social Insects. Boulder: Westview Press. 193–215 pp.
- Pavlov IP. 1927. Conditioned reflex. G.V. Anrep, trans. London: Oxford University, Press.
- Pessotti I, LÉSénéchal AM. 1981. Aprendizagem em abelhas. I- Discriminação simples em onze espécies. Acta amazonica 11(3): 653-658.
- Pyke GH, Pulliam HR, Charnov EL. 1977. Optimal foraging: a selective review of theory and tests. Q Rev Biol 52: 137-154.

- Raine NE, Ings TC, Ramos-Rodríguez O & Chittka L. 2006. Intercolony variation in learning performance of a wild British bumblebee population (Hymenoptera: Apidae: *Bombus terrestris audax*). *Entomol Gener* 28: 241-256.
- Raine NE, Chittka L. 2007. Pollen foraging: learning a complex motor skill by bumblebees (*Bombus terrestris*). *Naturwissenschaften* 94: 459-464.
- Raine NE & Chittka L. 2008. The correlation of learning speed and natural foraging success in bumble-bees. *Proc R Soc B* 275: 803-808.
- Raine NE & Chittka L. 2009. Measuring the adaptiveness of social insect foraging strategies – an empirical approach in Food Exploitation by Social Insects Ecological, Behavioral, and Theoretical Approaches. Editors: Stefan Jarau, Michael Hrncir Publisher: CRC Press. 9-28 pp.
- Ramalho M, Kleinert-Giovannini A & Imperatriz-Fonseca VL. 1989. Utilization of floral resources by species of *Melipona* (Apidae, Meliponinae): floral preferences. *Apidologie* 20: 185–195.
- Ramalho M. 2004. Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: A tight relationship. *Acta Bot Bras* 18: 37-47.
- Ramalho M, Silva MD & Carvalho CAL. 2007. Dinâmica de uso de fontes de pólen por *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae): uma análise comparativa com *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), no Domínio Tropical Atlântico. *Neotropical Entomology* 36(1): 038-045.
- Raveret-Richter M & Waddington K. 1993. Past foraging experience influences honey dance behaviour. *Anim Behav* 46: 123–128.
- Real LA. 1981. Uncertainty and pollinator-plant interactions: the foraging behavior of bees and wasps on artificial flowers. *Ecology* 62: 20-26.

- Reinhard J & Srinivasan MV. 2009. The role of scents in honey bee foraging and recruitment. In: Jarau S, Hrncir M (eds.) Food Exploitation by Social Insects: Ecological, Behavioral, and Theoretical Approaches. Boca Raton: CRC Press. 165-182 pp.
- Ribeiro MF. 1989. Estudos ecoetológicos em *Frieseomelitta languida*, Moure & Camargo, in litt (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Tese de mestrado, USP, São Paulo, 129 p.
- Robinson GE. 1987. Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behav Ecol Sociobiol* 20: 329–338.
- Robinson GE, Page RE Jr. 1989. Genetic basis for division of labor in an insect society, In: Breed MD, Page RE Jr (Eds.). *The genetics of social evolution*, Boulder, West view press. 61–81 pp.
- Robinson GE. 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Review of Entomology* 37: 637-665.
- Rodrigues AV, Roselino AC & Hrncir M. 2008. Stingless bees (*Melipona scutellaris*) learn to associate their “footprints” with rewarding food sources. Ribeirão Preto, SP, Brazil: Anais VIII° Encontro sobre Abelhas. p 546.
- Roselino AC, Hrncir M & Zucchi R. 2007. Stingless bees (*Melipona scutellaris*) learn to associate their “footprints” with depleted food sources. In *Proceedings of the Annual Meeting of the French Section of the IUSI*, Toulouse, France, p 75.
- Rospars JP. 1983. Invariance and sex-specific variations of the glomerular organization in the antennal lobes of a moth, *Mamestra brassicae*, and a butterfly, *Pieris brassicae*. *J Comp Neurol* 220: 80–96.
- Rospars JP. 1988. Structure and development of the insect antennodeutocerebral system. *Int J Insect Morphol Embryol* 17: 243-294.

- Rospars JP & Hildebrand JG. 2000. Sexually dimorphic and isomorphic glomeruli in the antennal lobes of the sphinx moth *Manduca sexta*. *Chem Senses* 25: 119–129.
- Roubik DW & Aluja M. 1983. Flight ranges of *Melipona* and *Trigona* in tropical forest. *J Kansas Entomol Soc* 56: 217–222.
- Saleh N & Chittka L. 2006. The importance of experience in the interpretation of conspecific chemical signals. *Behav Ecol Sociobiol* 61: 215-220.
- Sandoz JC, Laloï D, Odoux JF & Pham-Delègue MH. 2000. Olfactory information transfer in the honeybee: compared efficiency of classical conditioning and early exposure. *Anim Behav* 59: 1025-1034.
- Sandoz JC, Galizia CG & Menzel R. 2003. Side-specific olfactory conditioning leads to more specific odor representation between sides but not within sides in the honeybee antennal lobes. *Neuroscience* 120: 1137–1148.
- Sandoz CJ & Pham-Delègue MH. 2004. Spontaneous recovery after extinction of the conditioned proboscis extension response in the honeybee. *Learn Mem* 11: 586-597.
- Sandoz JC. 2006. Odour-evoked responses to queen pheromone components and to plant odours using optical imaging in the antennal lobe of the honey bee drone *Apis mellifera* L. *J Exp Biol* 209: 3587–3598.
- Scheiner R, Page RE & Erber J. 2004. Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 35: 133-142.
- Schildberger K. 1983. Local interneurons associated with the mushroom bodies and the central body in the brain of *Acheta domesticus*. *Cell Tissue Res* 230: 573-586.
- Schmid-Hempel P, Kacelnik A & Houston AI. 1985. Honeybees maximize efficiency by not filling their crop. *Behav Ecol Sociobiol* 17: 61-66.

- Schmid-Hempel P & Wolf T. 1988. Foraging efforts and life span of workers in a social insect. *The Journal of Animal Ecology* 57(2): 509-521.
- Schmidt VM, Zucchi R & Barth FG. 2003. A stingless bee marks the feeding site in addition to the scent path (*Scaptotrigona* aff. *depilis* MOURE 1942). *Apidologie* 34: 237-248.
- Schmidt VM, Zucchi R & Barth FG. 2005. Scent marks left by *Nannotrigona testaceicornis* at the feeding site: cues rather than signals. *Apidologie* 36: 285-291.
- Schmitt U & Bertsch A. 1990. Do foraging bumblebees scent-mark food sources and does it matter? *Oecologia* 82: 137–144.
- Schorkopf DLP, Jarau S, Francke W, Twele R, Zucchi R, Hrncir M, Schmidt VM, Ayasse M & Barth FG. 2007. Spitting out information: *Trigona* bees deposit saliva to signal resource locations. *Proc Biol Sci* 274: 895-898.
- Schorkopf DLP, Hrncir M, Mateus S, Zucchi R, Schmidt VM & Barth FG. 2009. Mandibular gland secretions of meliponine worker bees: further evidence for their role in interspecific and intraspecific defence and aggression and against their role in food source signalling. *The Journal of Experimental Biology* 212: 1153-1162.
- Seeley TD. 1995. *The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies*. Londres, Harvard University Press. 295 p.
- Shafir S, Wiegmann DD, Smith BH & Real LA. 1999. Risk-sensitive foraging: choice behavior of honeybees in response to variability in volume of reward. *Anim Behav* 57: 1055-1061.
- Shepherd GM. 1974. *The synaptic organization of the brain. An introduction*. New York: Oxford University Press.
- Shettleworth SJ. 1998. *Cognition, evolution, and behavior*. Oxford: Oxford Univ. Press

- Silva CEP & Schlindwein C. 2003. Fidelidade floral e características polínicas das plantas relacionadas à *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Fortaleza, VI Congresso de Ecologia do Brasil. 193-194 pp.
- Simões D & Bego LR. 1991. Division of labor, average life span and life table in *Nannotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Naturalia* 16: 81-97.
- Simonds V & Plowright CMS. 2004. How do bumblebees first find flowers? Unlearned approach responses and habituation. *Anim Behav* 67: 379-386.
- Skinner BF. 1938. The behavior of organisms. New York: D. Appleton-Century.
- Slaa EJ, Nieuwstadt MGL, Pisa LW & Sommeijer MJ. 1997. Foraging strategies of stingless bees (Apidae, Meliponinae): The relation between precision of recruitment, competition and communication, *Acta Horti* 437: 193–197.
- Slaa EJ, Cevaal A & Sommeijer MJ. 1998. Floral constancy in *Trigona* stingless bees foraging on artificial flower patches: a comparative study. *J Apicult Res* 37: 191–98.
- Slaa JE, Tack AJM & Sommeijer MJ. 2003. The effect of intrinsic factors on flowers constancy in stingless bees. *Apidologie* 34: 457-46.
- Smid HM, Bleeker MAK, van Loon·JJA & Vet LEM. 2003. Three-dimensional organization of the glomeruli in the antennal lobe of the parasitoid wasps *Cotesia glomerata* and *C. rubecula*. *Cell Tissue Res* 312: 237–248.
- Sommeijer MJ. 1984. Distribution of labour among workers of *M. favosa* F.: age-polyethism and worker oviposition. *Insectes Soc* 31(2): 171-184.
- Stephens DW & Krebs JR. 1986. Foraging theory. Princeton University Press, Princeton.
- Stocker RF, Lienhard MC, Borst A & Fischbach K-F. 1990. Neuronal architecture of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* 262: 9–34.

- Stocker RF. 1994. The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell and Tissue Research* 275: 3–26.
- Stout JC, Goulson D & Allen JA. 1998. Repellent scent-marking of flowers by a guild of foraging bumblebees (*Bombus spp.*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 43: 317–326.
- Stout JC & Goulson D. 2001. The use of conspecific and interspecific scent marks by foraging bumblebees and honeybees. *Anim Behav* 62: 183–189.
- Stout JC & Goulson D. 2002. The influence of nectar secretion rates on the responses of bumblebees (*Bombus spp.*) to previously visited flowers. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52: 239–246.
- Terada Y, Garofalo CA & Sakagami SF. 1975. Age-survival curves for workers bees (*Apis Mellifera* and *Plebeia droryana*) in a subtropical climate, with notes on worker polyethism in *P. droryana*. *Journal of Apicultural Research* 14(3-4): 161-170.
- Traniello JFA & Leuthold RH. 2000. Behavior and ecology of foraging in termites. In Abe T, Bignell DE, Higashi M (eds.) *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 141–68 pp.
- VanNieuwstadt MGL & Iraheta CER. 1996. Relation between size and foraging range in stingless bees (Apidae, Meliponinae). *Apidologie* 27: 219-228.
- Vickers NJ, Christensen TA & Hildebrand JG. 1998. Combinatorial odor discrimination in the brain: attractive and antagonist odor blends are represented in distinct combinations of uniquely identifiable glomeruli. *J Comp Neurol* 400: 35–56.
- Villa JD & Weiss MR. 1990. Observations on the use of visual and olfactory cues by *Trigona spp* foragers. *Apidologie* 21: 541-545.
- Vosshall LB, Wong AM & Axel R. 2000. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102: 147–159.

- Yamagata N, Nishino H & Mizunami M. 2007. Neural pathways for the processing of alarm pheromone in the ant brain. *J Comp Neurol* 505: 424–442.
- Waddington KD & Holden LR. 1979. Optimal foraging: on flower selection by bees. *Am Nat* 114: 179-196.
- Wakano JY, Nakata K & Yamamura N. 1998. Dynamic model for optimal age polyethism in social insects under stable and fluctuating environments. *J theor Biol* 193: 153-165.
- Wetherwax PB. 1986. Why do honeybees reject certain flowers? *Oecologia* 69: 567–570.
- Williams CS. 1998. The identity of the previous visitor influences flower rejection by nectar-collecting bees. *Anim Behav* 56: 673–681.
- Wille A. 1963. Behavioral adaptations of bee for pollen collecting from *Cassia* Flowers. *Rev Biol Trop* 11: 205-210.
- Willmer PG & Stone GN. 2004. Behavioral, ecological, and physiological determinants of the activity patterns of bees. *Adv Stud Behav* 34: 347-466.
- Wilms J & Eltz T. 2008. Foraging scent marks of bumblebees: footprint cues rather than pheromone signals. *Naturwissenschaften* 95: 149–153.
- Winnington AP, Napper RM & Mercer AR. 1996. Structural plasticity of identified glomeruli in the antennal lobes of the adult worker honey bee. *J Comp Neurol* 365: 479–490.
- Winston ML. 1987. *The biology of the honey bee*. Cambridge, MA, Harvard University Press, 281 pp.
- Witjes S & Eltz T. 2007. Influence of scent deposits on flower choice: experiments in an artificial flower array with bumblebees. *Apidologie* 38: 12-18.

Wright GA & Smith BH. 2004. Different thresholds for detection and discrimination of odors in the honey bee (*Apis mellifera*). *Chemical Senses* 29: 127-135.

Zube C, Kleineidam CJ, Kirschner S, Neef J & Rössler W. 2008. Organization of the olfactory pathway and odor processing in the antennal lobe of the ant *Camponotus floridanus*. *J Comp Neurol* 506: 425–441.

## ANEXO I

### **Tabela de Vida, Curva de Sobrevivência e Mortalidade de *Melipona scutellaris***

#### **Material e Métodos**

##### **Preparação das Abelhas**

Favos de cria com pupas de olhos pretos foram retirados de três colônias de *Melipona scutellaris* e separados em placas de Petri, junto com operárias adultas para auxiliarem na emergência das novas abelhas. As placas de Petri foram mantidas dentro de uma incubadora a 28°C para garantir o desenvolvimento adequado das pupas. A cada nova emergência, a abelha era retirada da placa, identificada e introduzida na colônia de observação. No total, 130 indivíduos foram marcados e depois de 10 minutos, tempo suficiente para secar a tinta, foram introduzidos na colônia de observação. O índice de rejeição destas abelhas foi de aproximadamente 5%, ou seja, 6 abelhas).

##### **Coleta de Dados**

As observações seguiram um protocolo de observação direta (anexo 1) realizada 5 vezes ao dia, em horários aleatórios. O tempo de observação variou de no mínimo 40' à no máximo 1 hora, somando em média 3h 30min/dia de observação. Neste protocolo era registrada a tarefa que as abelhas marcadas estavam realizando, no final de cada dia, havia informação sobre a idade das abelhas marcadas e as atividades que estavam desempenhando no momento das observações. As atividades que compuseram o protocolo

de observação seguem apresentadas por ordem crescente da idade de realização: enfermeira, construção de célula, POP (processo de aprovisionamento e postura de ovos), construção de potes de alimento, construção do invólucro, manipulação e retirada do lixo da colônia, desidratação de néctar, depósito de alimento nos potes, forrageamento. Este protocolo foi montado seguindo a arquitetura do ninho dentro da caixa de observação (Figura), concentricamente, do favo para o ambiente externo. No centro da colônia está a região da cria, os favos, nos seus arredores, os potes de alimentos, ambos envoltos pelo invólucro, na periferia da colônia, separadamente uma da outra estão, a área de concentração do lixo e as áreas onde as abelhas desidratam o néctar e, por último, a saída da abelha para o ambiente externo.

### **Análise dos Dados**

A análise dos protocolos de observação permitiu a confecção de uma tabela de vida, juntamente com as curvas de natalidade ( $lx$ ) e mortalidade ( $dx$ ) dos indivíduos da colônia. A tabela foi construída em intervalos de idade de 5 dias e informa: o número de indivíduos vivos em cada intervalo de idade ( $lx$ ), o número de indivíduos mortos em cada intervalo de idade ( $dx$ ), a proporção de indivíduos mortos em cada intervalo de idade ( $qx$ ) e a expectativa média de vida em cada intervalo de idade ( $ex$ ).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)