Sylvia Maria Matsuda

“Memória em Beija-Flores”

versão revisada

São Paulo
2008

Sylvia Maria Matsuda

“Memória em Beija-Flores”

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Doutor em Ciências,
na Área de Fisiologia Geral.

Orientador:
Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier

São Paulo
2008

Matsuda, Sylvia Maria

M 434m Memória em Beija-Flores/Sylvia Maria Matsuda. --
São Paulo: S. M. M., 2008
122 p. : il.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia.

1. Beija-flores- Memória 2. Memória Animal

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento
de Fisiologia. II. Título

LC QL 785.2

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier
Orientador

**“O especialista é um homem que sabe cada vez mais sobre cada vez
menos, e por fim, acaba sabendo tudo sobre nada.”**

George Bernard Shaw

Agradecimentos

Aos meus pais, Catarina e Tetsuhisa, pelo apoio aos meus estudos e à minha vida.

Ao meu marido Régis, pelo apoio, companheirismo e por fazer parte da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto Xavier, pelas primorosas aulas e por guiar meus caminhos por este trabalho.

Aos meus familiares, especialmente meus irmãos e cunhadas, Eduardo, Aninha, Marcio e Andrea, pela amizade e sentimento de família.

À Isabel e meus familiares por me ajudar a preparar e trocar as comidas dos beija-flores na hora certa.

Ao Ricardo Ferreira, André Frazão e Rodrigo Pavão pela ajuda com a análise estatística.

Ao pessoal do Laboratório de Neurociências e Comportamento pela amizade e troca de experiências.

Aos professores e funcionários do Instituto de Biociências da USP pelo suporte.

Índice

Resumo.....	06
Abstract.....	07
Capítulo 01. Introdução.....	08
1.1. Biologia dos Beija-flores.....	09
1.2. Aprendizagem e Memória.....	12
a) Aprendizagem e Memória nos Animais.....	15
b) Aprendizagem e Memória nos Beija-flores.....	18
1.3. Objetivos.....	19
Capítulo 02. Concentração Preferida de Sacarose.....	20
2.1. Introdução.....	21
2.2. Materiais e Métodos.....	22
a) Experimento 01 – Troca de Posição dos Bebedouros: 10 dias.....	23
b) Experimento 02 – Troca de Posição dos Bebedouros: 18 dias.....	24
c) Experimento 03 – Posições Fixas: 2x5 dias.....	25
2.3. Resultados.....	26
2.4. Discussão.....	33
Capítulo 03. Memória Espacial.....	38
3.1. Introdução.....	39
3.2. Materiais e Métodos.....	41
a) Experimento 04 - Memória Espacial: Teste em Cativeiro.....	41
b) Experimento 05 - Memória Espacial: Teste em Campo Aberto.....	42
c) Experimento 06 - Memória Espacial com o Uso de Pistas Intrínsecas: Teste em Campo Aberto.....	43
3.3. Resultados.....	44
3.4. Discussão.....	59
Capítulo 04. Memória Espaço-Temporal.....	62
4.1. Introdução.....	63
4.2. Materiais e Métodos.....	65
a) Experimento 07 - Memória Temporal com o Uso de Pistas Intrínsecas.....	66
b) Experimento 08 - Memória Espaço-Temporal: Distância de 40 centímetros Entre os Bebedouros.....	70
c) Experimento 09 - Memória Espaço-Temporal: Distância de 05 metros Entre os Bebedouros.....	73
4.3. Resultados.....	76
4.4. Discussão.....	91
Capítulo 05. Discussão Geral.....	98
Referências Bibliográficas.....	106

Resumo

Os beija-flores, por serem aves altamente especializadas na exploração de néctar e possuírem uma das maiores taxas metabólicas dentre os endotermos, são altamente dependentes de estratégias que otimizem a utilização dos recursos disponíveis no meio. Depreende-se, assim, que uma memória detalhada dos diferentes aspectos de seus recursos alimentares seja um importante componente do seu sucesso alimentar. Estudos recentes têm mostrado que alguns animais não humanos exibem a capacidade de lembrar “onde” e “quando” eventos específicos (“o quê”) ocorreram. Considera-se que o conhecimento concomitante sobre “o quê”, “onde” e “quando” caracteriza um tipo de memória denominada “memória episódica”, considerada, até então, privativa de seres humanos. A proposta do presente trabalho foi avaliar (1) a preferência de beija-flores das espécies *Amazilia lactea* e *Eupetomena macroura* por duas concentrações de solução de sacarose (“o quê”); na espécie *E. macroura* (2) sua memória espacial (“onde”) e sua memória sobre pistas intrínsecas associadas à fonte alimentar (“o quê”); e (3) sua capacidade de se recordar da hora do dia (“quando”) associada à localização espacial (“onde”) e à cor de alimentadores (“o quê”). Os resultados mostraram que os beija-flores são capazes de processar informações sobre “o quê”, “quando” e “onde” de seus recursos alimentares e que utilizam essas informações flexivelmente quando confrontados com diferentes situações experimentais, exibindo, assim, conhecimento sobre os principais elementos que caracterizam uma memória do tipo-episódica.

Abstract

Hummingbirds are highly specialized for nectar consumption as a main food source. Since these animals exhibit one of the highest metabolic rates among endotherms, they depend on strategies that optimize the use of the available food resources. Therefore, a detailed memory for the location, quality and time of food availability is likely to be an important component of their feeding strategies and success. Recent studies have shown that some non-human animals exhibit the capacity of remembering “where” and “when” specific events (“what”) occurred. Simultaneous recalling of “what”, “where” and “when” specific events occurred characterizes a kind of memory known as “episodic-memory”, considered, until recently, exclusive to humans. This study aimed at evaluating (1) the preference for either 20 or 40% sucrose solutions (“what”) by exemplars of *Amazilia lactea* and *Eupetomena macroura* hummingbirds, (2) the memory for spatial locations (“where”) and for intrinsic cues (“what”) associated with food resources by exemplars of *E. macroura*, and (3) the ability of exemplars of *E. macroura* to learn an association including the time of day (“when”) spatial locations (“where”) offered profitable colored feeders (“what”). The results showed that the hummingbirds are capable of memorizing information about “what”, “when” and “where” food resources are available and of using this information flexibly. Therefore, these results clearly indicate that hummingbirds exhibit an episodic-like type of memory.

Capítulo 01. Introdução

1.1. Biologia dos Beija-flores

A família Trochilidae dos beija-flores é uma das maiores famílias de aves da América, congregando um total de 328 espécies de ocorrência exclusiva no continente americano. Ela é subdividida em duas sub-famílias: Phaethornithinae, os eremitas, composta por 34 espécies, e Trochilinae, os beija-flores considerados típicos, composta por 294 espécies. Pouco se sabe sobre as relações de parentesco entre os trochilídeos devido, principalmente, à falta de fósseis e à concentração de estudos em caracteres anato-morfológicos complexos e em um pequeno número de taxa. Tentativas de classificação são discutíveis, em geral, devido à falta de um conhecimento sistemático baseado em anatomia funcional, morfologia, biogeografia e comportamento da maioria das espécies, resultando em interpretações questionáveis relacionadas às convergências, paralelismos ou a altos níveis de especialização, fenômeno comum dentre os beija-flores (SICK, 1997; del HOYO *et al.*, 1999).

Os beija-flores estão entre os animais que apresentam as maiores taxas metabólicas basais dentre os endotermos (DIAMOND *et al.*, 1986) devido, principalmente, ao seu tamanho diminuto e seu voo altamente especializado; eles estão dentre os menores vertebrados endotérmicos do mundo (SICK, 1997), com a maioria das espécies medindo de 6,0 a 12,0 cm e pesando de 2,5 a 6,5 g (del HOYO *et al.*, 1999) e exibem o voo pairado - voo de alta frequência de batida das asas, altamente custoso energeticamente - que os permite ficar virtualmente parados no ar enquanto se alimentam nas flores.

Seu voo pairado envolve adaptações únicas de esqueleto e musculatura de voo; e.g. possuem um esterno relativamente grande quando comparado com outras aves voadoras e oito pares de costelas, dois a mais que na maioria das outras aves, que os ajudam na estabilização durante o voo. Os ossos dos braços (úmero, rádio e ulna) são bastante reduzidos e mais de 70 % da asa é composta pelos ossos alongados da mão (del HOYO *et al.*, 1999). A sua musculatura do voo perfaz de um quarto até um terço de seu peso total – 50 % maior que nas outras aves - (GRENNEWALT, 1990) e é composta exclusivamente por fibras vermelhas escuras, com uma densidade mitocondrial de 35 % de seu volume, que proporciona energia para seu voo peculiar e energeticamente custoso (del HOYO *et al.*, 1999). Como o movimento da asa durante o voo pairado demanda muita energia, o músculo supracoracóide (antagonista) é praticamente igual ao seu agonista peitoral e, portanto, o beija-flor utiliza a força dos dois músculos para

movimentar a asa para cima e para baixo, ao contrário das outras aves que utilizam basicamente a força da musculatura peitoral (del HOYO *et al.*, 1999). O tamanho relativo do coração dos beija-flores é o maior conhecido em aves e constitui uma das bases para a sua extrema atividade. Perfazendo de 1,9 a 2,5 % do peso total do seu corpo - num pardal, o coração representa 1,39 % do corpo e, no homem, apenas 0,5 % do peso total do corpo - calcula-se que o coração do beija-flor em vôo movimenta o sangue 100 vezes mais depressa que no homem. Seus pulmões são grandes e de estrutura simples (não possuem válvulas), o que facilita a alta frequência da respiração, perfazem junto aos sacos aéreos 14 a 22 % do peso total do beija-flor e sua frequência respiratória em repouso é de cerca de 260 inspirações por minuto, sendo que no pombo é de 29 (SICK, 1997).

Os trochilídeos estão dentre as raras aves que possuem a capacidade de entrar em torpor (SICK, 1997), mecanismo de conservação de energia pela redução na taxa metabólica do organismo (HAINSWORTH *et al.*, 1977). Acredita-se que se trate de uma estratégia adotada por essas aves em situações de estresse energético, quando seu limiar de reserva de energia não é atingido ao final do dia (HAINSWORTH *et al.*, 1977), apesar de episódios de torpor noturno terem sido reportados em beija-flores na ausência de estresse energético (BECH *et al.*, 1997), e também terem sido apontados como uma estratégia de conservação de gordura em beija-flores migratórios (CARPENTER & HIXON, 1988).

Os beija-flores estão entre os animais menos sociais dentre as aves. Em geral, machos e fêmeas defendem territórios e seu comportamento agressivo varia desde a simples vocalização para avisar o intruso que invadiu seu território até o confronto direto com seu oponente. Seu comportamento agressivo está relacionado com a defesa de territórios alimentares para assegurar um adequado suprimento de néctar. Um dos poucos exemplos de comportamento cooperativo pode ser observado quando um grupo de beija-flores se junta para expulsar potenciais predadores de seus territórios, como cobras, gatos, corujas ou falcões (WILLIAMSON, 2002).

Para atingir sua necessidade energética diária, devem se alimentar abundante e regularmente de néctar de flores, chegando a ingerir mais de uma vez e meia seu peso corpóreo em alimento (WILLIAMSON, 2002). Sua dieta é composta por aproximadamente 90% néctar, que fornece a energia imediata necessária na manutenção de seu alto metabolismo, e 10% de artrópodes e pólen, que são basicamente fontes protéicas e lipídicas (del HOYO *et al.*, 1999). Altamente dependentes da

disponibilidade de flores no seu habitat, os beija-flores têm papel importante na polinização de muitas espécies vegetais; fala-se até de plantas troquilógamas, numerosas na fauna brasileira, constituindo numa das contribuições neotropicais mais importantes à ornitofilia de plantas (SICK, 1997). Em geral, são plantas de flores grandes, solitárias ou dispostas em pequenos cachos, pendentes ou disponibilizadas horizontalmente, de corolas longas, tubulares e sem essência, tipicamente de cores vibrantes vermelhas, laranjas, amarelas ou combinações.

Sua visão corresponde à principal modalidade sensorial para o forrageamento (del HOYO *et al.*, 1999), sendo as aves, em geral, altamente sensíveis às cores. Possuem gotas de óleo coloridas (*oil droplets*) em seus cones, que funcionam como filtros que aumentam a capacidade de discriminação dentre objetos coloridos (VOROBYEV, 2003). São especialmente sensíveis às ondas longas - região vermelha - do espectro luminoso (del HOYO *et al.*, 1999) e diversos estudos mostram picos de sensibilidade espectral cerca de 20 nm acima das ondas longas visíveis aos humanos (ver STILES, 1976). Ainda, enquanto os humanos possuem três diferentes tipos de cones fotorreceptores, com picos de sensibilidade máxima aos comprimentos de onda de 445, 535 e 570 nanômetros (nm) que lhes permitem enxergar comprimentos de onda de 400 a 700 nm (GUYTON & HALL, 2002), estudos com diversas espécies de aves e répteis mostraram a presença de um quarto tipo de cone, com sensibilidade inferior aos cones humanos e pico de sensibilidade de 409-418 nm ou de 360-380 nm, dependendo do grupo de ave (BOWMAKER *et al.*, 1997). É bastante provável que os beija-flores possuam este quarto tipo de cone (del HOYO *et al.*, 1999); de fato, GOLDSMITH (1980) descreveu, em três espécies de trochilídeos, a capacidade de enxergar comprimentos de ondas de 370 nm, i.e., abaixo do espectro visível aos humanos.

Depreende-se assim que os beija-flores, por serem aves altamente especializadas na exploração de néctar e possuírem uma das maiores taxas metabólicas dentre os endotermos, são altamente dependentes de estratégias que otimizem a utilização dos recursos disponíveis no meio. Acredita-se que uma memória apurada constitua um importante componente do seu sucesso alimentar; além de beneficiar-se de informações sobre a distribuição espaço-temporal e padrões de cores das flores em seu território, a capacidade de evitá-las quando “depreciadas” (i.e., imediatamente após o consumo do néctar) e de retornar às mesmas depois de decorrido o intervalo de tempo necessário para a reposição do néctar, representariam importantes vantagens adaptativas para seu balanço energético.

1.2. Aprendizagem e Memória

Aprendizagem é o processo através do qual o organismo adquire conhecimento sobre o mundo, enquanto memória é o processo pelo qual o conhecimento é codificado, retido e, posteriormente, recuperado (KANDEL *et al.*, 2003). Até a metade do século XX, os cientistas duvidavam que a memória pudesse ser localizada no sistema nervoso e que fosse uma função independente das outras funções cognitivas, como da linguagem, percepção ou movimento. Atualmente, sabe-se que além da existência de diferentes tipos de memória, seu processamento envolve diferentes regiões do encéfalo.

KANDEL e col. (2003) fizeram um breve histórico das principais descobertas que levaram ao entendimento atual dos processos de aprendizagem e memória em humanos.

A descoberta de Pierre Paul Broca, em 1861, de que uma lesão específica numa porção posterior do lobo frontal esquerdo (posteriormente denominada Área de Broca) produz um déficit específico de linguagem, desencadeou uma série de estudos a procura de circuitos neuronais discretos que pudessem estar relacionados a outras funções mentais, tais como percepção e movimento voluntário. O sucesso dos esforços suscitou a questão de se os mecanismos de memória também estariam relacionados a sistemas discretos no encéfalo e se sim, se estariam localizados em uma única região ou distribuídos de maneira mais ampla. Wilder Penfield, neurocirurgião do século XX, foi o primeiro a obter evidências da modularidade dos processos de memória. Ele estimulou eletricamente a superfície do encéfalo de mais de 1.000 pacientes submetidos a cirurgias encefálicas como forma de tratamento a epilepsia, e relatou que a estimulação (em 8 % dos casos) no lobo temporal produzia o que ele chamou de uma *resposta vivencial* - uma recordação coerente de uma experiência. Mas Penfield recebeu críticas da comunidade científica que alegava que as respostas poderiam ser resultado da atividade epilética de seus pacientes, uma vez que todos apresentavam crises epiléticas com foco no lobo temporal esquerdo, justamente a localidade mais efetiva para gerar as tais respostas vivenciais.

Foi a partir da década de 1950 que surgiram evidências de que o lobo temporal seria de fato importante para a memória a partir de estudos em pacientes que haviam sido submetidos à remoção bilateral do hipocampo e regiões vizinhas do lobo temporal medial, como tratamento de epilepsia. Os efeitos da remoção bilateral de porções do lobo temporal foram extensamente estudados no paciente H. M., então com 27 anos de

idade, que vinha sofrendo de epilepsia há mais de 10 anos como resultado de uma lesão encefálica provocada por um acidente em sua infância. Para a remoção do foco epiléptico foram extraídos bilateralmente os dois terços anteriores do hipocampo, a amígdala e partes da área associativa multimodal do córtex temporal. O paciente H. M. teve suas crises epiléticas eliminadas, mas com um efeito colateral: um extensivo déficit na formação de novas memórias e na recordação de experiências ocorridas poucos anos antes da cirurgia. Esse déficit de memória era bem específico. i.e, H.M. tinha uma memória de curta duração normal, por segundos ou minutos, e uma memória de longa duração para eventos que ocorreram muito antes de sua cirurgia também intacta. Ainda manteve um bom comando de linguagem e seu QI se manteve normal. O que H. M. havia perdido era a sua capacidade de transformar memória de curta duração em memória de longa duração, sendo incapaz de reter por mais de um minuto informações sobre pessoas, lugares ou objetos novos.

Apesar de pacientes como H. M. apresentarem profundos déficits de memória, eles são capazes de aprender certos tipos de tarefas e de reter essa aprendizagem do mesmo modo que indivíduos normais, apesar de não lembrarem que executaram tais tarefas. Por exemplo, são capazes de aprender tarefas motoras, assim como tarefas simples como habituação, sensibilização, condicionamento clássico e operante, além de serem capazes de melhorar seu desempenho em tarefas perceptuais como a pré-ativação (ou *priming*). Essas tarefas possuem dois aspectos em comum. O primeiro é que elas tendem a ser adquiridas por treinamento repetitivo, sendo sua aquisição gradual como no caso de hábitos ou habilidades motoras. O segundo aspecto é que elas não requerem conhecimento consciente passível de relato verbal ou processos cognitivos complexos, como comparação ou avaliação; assim, seu conteúdo manifesta-se por meio do desempenho habilidoso, sendo de difícil manifestação por meio de relatos verbais.

Atualmente distinguem-se duas formas fundamentais de memória baseadas no tempo de retenção: a de curta duração e a de longa duração. A memória de curta duração ou memória operacional é um conceito hipotético que se refere ao arquivamento temporário da informação para o desempenho de uma diversidade de tarefas cognitivas, como manter uma conversa, fazer uma conta, planejar compras. Os sistemas de memória de curta e longa duração transferem informações continuamente de um para outro. Já a memória de longa duração parece incluir um módulo de memória implícita (ou não-declarativa) e outro de memória explícita (ou declarativa). A memória implícita é expressa por meio de desempenho habilidoso de certas tarefas que incluem

habilidades motoras ou perceptuais, sendo caracteristicamente mais rígida e fortemente conectada às condições iniciais em que a aprendizagem ocorreu. Já a memória explícita envolve a recordação consciente passível de relato verbal, além de ser extremamente flexível, por envolver a associação de vários itens de informação. TULVING (2001) considera ainda que a memória explícita inclua um módulo episódico e semântico. A memória episódica envolveria a lembrança de “onde” e “quando” eventos e experiências pessoais (“o quê”) ocorreram, sendo, portanto, autobiográfica e, a memória semântica envolveria fatos, ou seja, conhecimentos factuais não relacionados ao contexto espaço-temporal específicos em que foram adquiridos.

A Tabela 01 mostra uma classificação de diferentes tipos de memória de longa duração em humanos, assim como os substratos neurais críticos associados aos seus processamentos.

Tabela 01. Os diferentes tipos de memória de longa duração humana associados aos substratos neurais críticos para seus processamentos (Modificado de SQUIRE, 1987 *apud* KANDEL *et al.*, 2003).

Memória Explícita (Declarativa)	
- Fatos -----	Lobo Temporal Medial
- Eventos -----	Lobo Temporal Medial
Memória Implícita (Não-Declarativa)	
- Pré-Ativação (<i>Priming</i>)-----	Neocórtex
- Procedimento (Habilidades e Hábitos)-----	Estriado
- Aprendizagem Associativa: Condicionamento Clássico e Operante:	
- Respostas Emocionais-----	Amígdala
- Musculatura Esquelética-----	Cerebelo
- Aprendizagem não-associativa: Habituação e Sensibilização-----	Vias Reflexas

O neuropsicólogo Donald Hebb (1904-1985) propôs que não existiria uma região única para o armazenamento da memória e que muitas partes do encéfalo participam da representação de um evento singular (DALMAZ & NETTO, 2004). Isto não significa que todas as regiões estejam igualmente envolvidas no armazenamento da informação; diferentes áreas podem armazenar diferentes aspectos das memórias e diferentes regiões as processam e as recuperam. Acredita-se hoje que a memória envolve vários sistemas ou módulos encefálicos separados que processariam diferentes aspectos do conhecimento adquirido. Esses sistemas interagem, possibilitando a utilização do conhecimento adquirido e retido, resultando numa representação única,

que em última instância irá se traduzir no comportamento individual (SCHACTER & TULVING, 1994).

a) Aprendizagem e Memória nos Animais

Os estudos da memória em animais de diferentes espécies são importantes na construção e consolidação de modelos que ajudam no entendimento dos mecanismos de formação e evolução da memória e que podem, dentro de certos limites, ser comparados ou extrapolados ao comportamento humano. Testes de memória são muito utilizados na investigação de questões evolutivas e/ou ecológicas de grupos filogenéticos pela análise das diferenças ou semelhanças das respostas comportamentais frente a uma mesma tarefa. Ao contrário dos humanos, a pesquisa com animais permite a manipulação invasiva, como por exemplo, a lesão em áreas encefálicas específicas na procura de possíveis perdas mnemônicas.

Como a memória não pode ser diretamente observada nos encéfalos, sua presença deve ser inferida a partir da expressão comportamental do organismo (THORPE *et al.*, 2004). Alguns autores chegam a definir memória como a própria mudança de comportamento em função de experiências anteriores (XAVIER, 1993; KANDEL *et al.*, 2003). Em humanos, conforme discutido anteriormente, a memória pode ser acessada e expressa por meio da linguagem, escrita ou habilidades motoras; porém, em animais esta só pode ser inferida a partir de respostas comportamentais observáveis (THORPE *et al.*, 2004). No geral, em testes de memória disponibiliza-se uma informação ao animal e compara-se o comportamento pré- e pós-exposição, havendo diferenças (estatisticamente embasadas), infere-se que o animal reteve a informação na memória.

Em animais não humanos, não se reconhece a divisão memória explícita e implícita, justamente por esta se basear em estados de consciência e linguagem, parâmetros aplicáveis a humanos, mas que, apesar da extensa discussão, ainda não passíveis de extensão aos demais animais. Por sua natureza não declarativa, estuda-se tradicionalmente nos animais os tipos de aprendizagem associativa e não-associativa que, conforme colocado, envolvem treinamento extensivo, sendo caracteristicamente inflexíveis (LENT, 2001).

Nos últimos anos é crescente a discussão acerca das capacidades mnemônicas animais que se assemelham à natureza explícita da memória declarativa humana na

resolução de problemas. Foi demonstrado que um pássaro estocador de alimento (*Aphelocoma coerulescens*) se lembra de “onde” (localização espacial) e “quando” (intervalo de tempo decorrido) havia estocado itens alimentares específicos (“o quê”), exibindo uma memória que os autores caracterizaram como sendo do tipo-episódica (CLAYTON & DICKINSON, 1998). Uma memória do tipo-episódica foi posteriormente demonstrada em pombos (ZENTALL *et al.*, 2001), camundongos (DERE *et al.*, 2005) e ratos (BABB & CRYSTAL, 2006).

Assim como o lobo temporal medial, em particular o sistema hipocampal, seria o responsável pelo processamento da memória explícita nos humanos, o mesmo ocorreria nos animais (EICHENBAUM, 1994). Acredita-se que a memória genuinamente espacial em animais seja um tipo de memória “explícita”, por envolver o mesmo substrato neuro-anatômico da memória declarativa dos humanos e pela sua natureza flexível, já que permite a operação por atalhos, quando disponíveis. De fato, diversos estudos mostram o papel do sistema hipocampal no processamento da memória contextual (JARRARD, 1993; REIS *et al.*, 1999; MAREN & HOLT, 2000; RICHMOND & COLOMBO, 2002; GALLO, 2005), que envolve a lembrança de um evento (“o quê”) associado às pistas espaciais (“onde”) e/ou intrínsecas (como cores ou padrão de cores) do ambiente em que foi adquirido; pombos e ratos, cujo hipocampo foi lesado, treinados a discriminar diferentes situações de reforço em diferentes contextos, apresentam prejuízos no seu desempenho em relação ao controle, fato atribuído à inabilidade desses animais lesados em utilizar as pistas contextuais do ambiente na discriminação (GOOD & HONEY, 1991; JARRARD, 1993; RICHMOND & COLOMBO, 2002). Propõe-se que os animais formem “mapas cognitivos” do ambiente, isto é, constructos neurais que representariam os objetos e suas relações num dado ambiente (TOLMAN, 1932 *apud* XAVIER, 1986). Em 1971, O’KEEFE e DOSTROVSKY sugeriram que o hipocampo seria o responsável por manter o “mapa cognitivo” do ambiente espacial do animal; esses autores mostraram que células piramidais individuais do hipocampo de ratos disparam em diferentes padrões dependendo da localização do indivíduo no espaço e, quando em novos locais, formam novos padrões de disparos, que permanecem estáveis por semanas ou meses. De fato, animais submetidos a lesões no hipocampo apresentam seu desempenho comprometido em tarefas que envolvem a lembrança da localização espacial do estímulo (JARRARD, 1993, XAVIER & MAGILA, 1996). Além disso, o tamanho relativo do hipocampo tem

sido positivamente correlacionado à quantidade de informações espaciais que espécies de aves estocadoras de alimento processam (HEALY, 1996).

EICHENBAUM (1994) sugeriu que o sistema hipocampal é responsável pelo processamento de uma representação relacional de itens de memória, com uma propriedade crítica de flexibilidade representativa, qualidade que permitiria o uso inferencial das memórias em novas situações, ou seja, a recuperação de memórias numa variedade de contextos fora da situação inicial de aprendizagem e permitiria a expressão das memórias por várias vias de expressão comportamental. Esta visão abarca tanto os aspectos funcionais da memória declarativa humana quanto da formação dos “mapas cognitivos” em animais, ao colocar o hipocampo como um sistema agregador de informações, crítico na recuperação e expressão de memórias flexíveis que envolvem o processamento conjunto de diferentes aspectos do ambiente.

Segundo EICHENBAUM (1994), ao se considerar que a memória declarativa pode ser atribuída também aos outros animais, e que ela pode ser avaliada por meio de vários paradigmas comportamentais utilizados nos estudos de aprendizagem animal, eleva-se o entendimento sobre os sistemas de memória em pelo menos três maneiras distintas: a) uma caracterização única da função hipocampal juntaria os estudos sobre memória humana e animal há muito tratados separadamente. Mesmo se demonstrado que apenas algumas propriedades são compartilhadas, o conhecimento sobre quais propriedades são ou não compartilhadas podem revelar ensaios (“*insights*”) sobre a evolução da função hipocampal na memória declarativa; b) uma visão geral também integraria relatos separados que tentam explicar a função hipocampal em animais. Várias hipóteses evoluíram separadamente e concorrentemente, baseadas em um número limitado de paradigmas comportamentais. Acredita-se que as diferentes posições teóricas refletem diferentes aspectos de um tipo único de processamento funcional; c) ao demonstrar uma continuidade entre a função hipocampal de humanos e animais pode-se vislumbrar quais aspectos da memória declarativa humana poderiam ser propriamente modeladas nos animais, dando uma base a uma diversidade de estudos neurobiológicos focados na circuitaria que suporta esse tipo de processamento mnemônico.

b) Aprendizagem e Memória nos Beija-flores

Estudos de aprendizagem e memória mostram que os beija-flores possuem grande capacidade em responder a manipulações experimentais que envolvem a lembrança da disposição espacial e das características intrínsecas (como cores padrão de cores) de bebedouros artificiais. Diversos trabalhos indicam que os beija-flores possuem uma representação detalhada das flores de seu território, incluindo informações sobre a concentração e volume do seu alimento (RUSCHI, 1953; TAMM & GASS, 1986; ROBERTS, 1996; BATESON *et al.*, 2003), sua localização espacial (COLLIAS & COLLIAS, 1968; MILLER & MILLER, 1971; MILLER *et al.*, 1985; BROWN & GASS, 1993; HURLY, 1995; HURLY & HEALY, 1996; HENDERSON *et al.*, 2001), a cor e padrões de cores das flores (COLLIAS & COLLIAS, 1968; MILLER & MILLER, 1971; MILLER *et al.*, 1985; HURLY & HEALY, 2002) e a taxa de renovação do néctar das flores (HENDERSON *et al.*, 2006).

Porém, poucos estudos enfocaram na discussão de um processamento integrado de aspectos do ambiente na procura por uma memória caracteristicamente do tipo-episódica. Não parece haver estudos sobre a percepção da hora do dia pelos beija-flores e estudos que envolva o uso de pistas visuais associadas ao local de oferecimento de alimento ao longo de vários dias de teste. Observa-se ainda que dentre os poucos estudos sobre esse tema, a maioria foi realizada com espécies norte-americanas; apenas um estudo de preferência por cor e concentração do alimento (RUSCHI, 1953) e alguns estudos de condicionamento operante (FRUTUOSO, 1995) envolveram espécies de ocorrência do território brasileiro.

1.3. Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar (1) a preferência de beija-flores das espécies *Amazilia lactea* e *Eupetomena macroura* por duas concentrações de solução de sacarose (“o quê”); na espécie *E. macroura*, (2) sua memória espacial (“onde”) e sua memória sobre pistas intrínsecas associadas à fonte alimentar (“o quê”) e, (3) sua capacidade de se recordar da hora do dia (“quando”) associada à localização espacial (“onde”) e à cor de alimentadores (“o quê”). No conjunto, discutir o uso desses diferentes aspectos de seus recursos alimentares e sua implicação na ecologia e no entendimento dos processos de aprendizagem desses animais.

Capítulo 02. Concentração Preferida de Sacarose

2.1. Introdução

Em flores primariamente visitadas por beija-flores, a concentração de açúcar no néctar varia, em média, de 20 a 25% (açúcar equivalente a sacarose; massa/massa total) (RUSCHI, 1953; BAKER, 1975; PYKE & WASER, 1981; McDADE & WEEKS, 2004; MENDONÇA & ANJOS, 2006).

A fim de verificar se os beija-flores demonstram preferência por diferentes concentrações de açúcar, RUSCHI (1953) realizou um experimento com 23 espécies de beija-flores de ocorrência no território brasileiro, no qual oferecia concomitantemente oito bebedouros contendo concentrações distintas de açúcar (10%, 12%, 15%, 18%, 20%, 23%, 25% e 30%). Observou-se que as concentrações mais visitadas encontravam-se entre 15% e 25%, e que os animais evitavam as concentrações com porcentagens extremas (10%, 12% e 30%). O autor concluiu que estas seriam as concentrações preferidas por se aproximarem das concentrações de néctar usualmente obtidas das flores visitadas pelos beija-flores.

Porém, as conclusões de RUSCHI (1953) contrariam as observações de outros autores que trabalharam com espécies norte-americanas; em testes de escolha estas últimas tendem a preferir as soluções mais concentradas, i.e., acima dos 20-25% (VAN RIPER, 1958; HAINSWORTH & WOLF, 1976; STILES, 1976; PYKE & WASER, 1981, TAMM & GASS, 1986, ROBERTS, 1996).

O objetivo deste conjunto de experimentos foi avaliar a preferência por duas soluções de sacarose com concentrações distintas (20% e 40%) por beija-flores da nossa fauna, incluindo espécimes de *Amazilia lactea* e *Eupetomena macroura*, e comparar com os dados conflitantes da literatura.

2.2. Materiais e Métodos

Foram realizados três experimentos envolvendo a manipulação das concentrações de soluções de sacarose. Em todos, a atração inicial dos animais foi possível pelo uso de um bebedouro comercial com solução de sacarose a 20% (Figura 01a); observada a ocorrência de visitas constantes, foram disponibilizados, por cinco dias consecutivos, dois bebedouros experimentais idênticos (tubos de plástico tipo Falcon de 50 mL, com uma flor amarela de plástico fixada na extremidade – Figura 01b), distantes 40 cm horizontalmente, com solução de sacarose a 30% em ambos; posteriormente, dava-se início ao período de teste. O teste consistiu em oferecer duas concentrações de solução de sacarose distintas, 20% e 40%, ao longo de vários dias, concomitantemente à realização de diferentes manipulações, dependendo do experimento.

Figura 01. a) Bebedouro comercial utilizado na atração inicial dos beija-flores; b) bebedouros experimentais distantes em 40 cm horizontalmente.

Todos os testes foram realizados em campo aberto e as visitas aos bebedouros monitoradas por câmeras, que permitiram a gravação dos animais e a identificação individual por diferenças específicas de suas penas. O exemplar de *A. lactea* foi identificado por sua inicial “A” e os exemplares de *E. macroura* por sua inicial “E”; apenas indivíduos que realizaram visitas ao longo de todos os dias dos experimentos foram levados em conta na análise. No Experimento 01, um indivíduo de *A. lactea* foi identificado por beija-flor A₁ e os indivíduos de *E. macroura* por beija-flores E₁ e E₂. No Experimento 02, os indivíduos de *E. macroura* foram identificados por E₃, E₄ e E₅ e no Experimento 03, por beija-flores E₆ e E₇.

Os beija-flores visitam as fontes alimentares de forma regular. Um surto de visitas é aqui definido pela aproximação do animal ao local dos bebedouros, quando se

alimentam de um ou ambos os bebedouros, e posterior distanciamento por pelo menos um minuto (usualmente esse distanciamento se dá por uma média de 5 a 10 minutos). Cada visita é definida pela inserção do bico em um dos bebedouros pelo menos uma vez (uma bicada); porém, numa mesma visita podem ocorrer várias bicadas. No presente experimento, analisou-se o número de visitas por dia, o número de bicadas por visita e a sequência de visitas ao longo de cada dia de experimento.

a) Experimento 01 - Troca de Posição dos Bebedouros: 10 dias

Este experimento envolveu exemplares de duas espécies de beija-flores, incluindo um indivíduo da espécie *A. lactea* (beija-flor A_1), testado entre os dias 28 de junho a 12 de julho de 2004 no Laboratório de Neurociências e Comportamento, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, e dois indivíduos da espécie *E. macroura* (beija-flores E_1 e E_2), testados entre os dias 14 a 24 de agosto de 2004 no Bairro Campo Belo, na cidade de São Paulo.

O teste consistiu em oferecer as soluções de sacarose com concentração a 20% e 40%, concomitantemente, por 10 dias consecutivos, das 14:00 às 18:00 h. No restante do tempo era disponibilizado apenas o bebedouro comercial contendo solução de sacarose a 30%. De maneira semi-aleatória, as posições das soluções variavam a cada dia segundo a disposição na Tabela 02. A fim de padronizar, a mesma ordem de posições foi usada para os indivíduos de ambas as espécies.

Tabela 02. Desenho experimental mostrando a disposição das soluções de sacarose com concentrações a 20% e 40% a cada dia de teste.

Dias	Esquerda	Direita
1	20%	40%
2	40%	20%
3	40%	20%
4	20%	40%
5	40%	20%
6	20%	40%
7	20%	40%
8	40%	20%
9	40%	20%
10	20%	40%

b) Experimento 02 - Troca de Posição dos Bebedouros: 18 dias

Este experimento envolveu um desenho experimental semelhante ao anterior; porém, os testes ocorreram ao longo de 18 dias, no período de 26 de fevereiro a 15 de março de 2005, segundo a disposição apresentada na Tabela 03, e envolveu apenas três indivíduos da espécie *E. macroura* (beija-flores E₃, E₄ e E₅), uma vez que exemplares de *A. lactea* pararam de visitar o local.

Tabela 03. Desenho experimental mostrando a disposição das soluções de sacarose com concentrações a 20% e 40% a cada dia de teste.

Dias	Esquerda	Direita
1	20%	40%
2	40%	20%
3	20%	40%
4	40%	20%
5	20%	40%
6	20%	40%
7	40%	20%
8	20%	40%
9	40%	20%
10	20%	40%
11	40%	20%
12	40%	20%
13	20%	40%
14	40%	20%
15	20%	40%
16	20%	40%
17	40%	20%
18	40%	20%

c) Experimento 03 - Posições Fixas dos Bebedouros – 2x5 dias.

Este experimento, desenvolvido entre os dias 12 e 21 de dezembro de 2006, envolveu dois indivíduos da espécie *E. macroura* (beija-flores E₆ e E₇) e uma manipulação distinta; ao longo de cinco dias inteiros (das 06:00 às 18:00 h) e consecutivos, as duas concentrações foram mantidas em locais fixos. Então, no sexto dia, as posições foram alteradas mantendo-as, a partir de então no mesmo local, por outros cinco dias inteiros e consecutivos (ver Tabela 04).

Tabela 04. Desenho experimental mostrando a disposição das soluções de sacarose com concentrações a 20% e 40% a cada dia de teste.

Dias	Esquerda	Direita
1	20%	40%
2	20%	40%
3	20%	40%
4	20%	40%
5	20%	40%
6	40%	20%
7	40%	20%
8	40%	20%
9	40%	20%
10	40%	20%

2.3. Resultados

A Tabela 05 apresenta as medianas e variações interquartis (quartil 25 e quartil 75) e a Figura 02 o “*boxplot*” do número de visitas realizadas a cada um dos bebedouros contendo solução de sacarose a 20% e 40% por dia de experimento, de todos os indivíduos envolvidos no estudo. Observa-se que os indivíduos A₁ e E₆ realizaram um número significativamente maior de visitas por dia ao bebedouro contendo sacarose a 40% (Teste de Friedman, $p < 0,05$), sendo que o indivíduo E₇ apresentou uma tendência a um maior número de visitas ao bebedouro contendo sacarose a 40% (Teste de Friedman, $p = 0,056$); para os demais indivíduos não houve diferença significativa entre os número de visitas por dia ao bebedouros contendo as diferentes concentrações.

Tabela 05. Medianas e intervalos interquartis (quartil 25 e quartil 75) do número de visitas realizadas a cada um dos bebedouros contendo solução de sacarose a 20% e 40% e a significância estatística (Teste de Friedman, p-valor) da comparação entre os escores relativos às diferentes concentrações pelos beija-flores A₁, E₁, E₂, E₃, E₄, E₅, E₆ e E₇; os asteriscos simples (*) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) e os asteriscos duplos (**) indicam uma tendência a diferenças significativas ($0,10 < p < 0,05$).

			visitas/dia			signif.	
			Q25	mediana	Q75	p-valor	
Exp. 01	beija-flor A ₁	concentração	20%	4,75	8,50	10,50	0,008 *
		40%	6,75	13,50	15,00		
	beija-flor E ₁	20%	4,75	6,50	10,75	0,705	
		40%	6,00	9,50	12,25		
	beija-flor E ₂	20%	3,00	7,00	9,00	0,317	
		40%	1,50	3,00	7,25		
Exp. 02	beija-flor E ₃	20%	3,75	7,00	12,25	0,637	
		40%	4,75	8,50	15,25		
	beija-flor E ₄	20%	3,75	6,00	10,00	1,000	
		40%	4,00	6,50	10,00		
	beija-flor E ₅	20%	1,00	3,00	4,50	1,000	
		40%	1,00	4,00	6,00		
Exp. 03	beija-flor E ₆	20%	21,00	25,50	30,00	0,002 *	
		40%	41,75	51,50	55,25		
	beija-flor E ₇	20%	13,75	17,00	30,25	0,058 **	
		40%	18,75	24,50	27,25

Figura 02. “Boxplot” do número de visitas realizadas por dia aos bebedouros contendo sacarose a 20% e 40% pelos beija-flores A₁, E₁, E₂, E₃, E₄, E₅, E₆ e E₇. Os limites inferior e superior do retângulo indicam, respectivamente, o quartil 25 e 75, a linha horizontal dentro do retângulo indica a mediana, as barras que partem do retângulo expressam as medidas máximas e mínimas e os asteriscos acima destas barras indicam os *outliers* da distribuição. Comparando os escores relativos às diferentes concentrações, os asteriscos simples (*) indicam diferenças significativas (Teste de Friedman, $p < 0,05$) e os asteriscos duplos (**) indicam uma tendência a diferenças significativas (Teste de Friedman, $0,10 < p < 0,05$).

A análise do número de bicadas por visita (Tabela 06 e Figura 03) mostra que os indivíduos E₁, E₅ e E₆ realizaram um número significativamente maior de bicadas por visita ao bebedouro contendo sacarose a 40% (Teste de Friedman, $p < 0,05$), sendo que o indivíduo E₇ apresentou uma tendência a um maior número de bicadas por visita ao bebedouro contendo sacarose a 40% (Teste de Friedman, $p = 0,0813$); para os demais indivíduos não foram encontradas diferenças significativas.

Tabela 06. Medianas e intervalos interquartis (quartil 25 e quartil 75) do número de bicadas por visita realizadas a cada um dos bebedouros contendo solução de sacarose a 20% e 40% e a significância estatística (Teste de Friedman, p-valor) da comparação entre os escores relativos às diferentes concentrações pelos beija-flores A₁, E₁, E₂, E₃, E₄, E₅, E₆ e E₇; os asteriscos simples (*) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) e os asteriscos duplos indicam uma tendência a diferenças significativas ($0,10 < p < 0,05$).

			bicadas/visita			signif.
			concentração	Q25	mediana	Q75
Exp. 01	beija-flor A ₁	20%	2,00	2,00	4,00	0,139
		40%	2,00	3,00	4,00	
	beija-flor E ₁	20%	1,00	2,00	3,00	0,024*
		40%	1,00	2,00	6,00	
	beija-flor E ₂	20%	1,50	3,50	7,00	0,294
		40%	2,00	5,00	8,25	
Exp. 02	beija-flor E ₃	20%	1,00	2,00	5,00	0,208
		40%	1,00	3,00	5,00	
	beija-flor E ₄	20%	1,00	1,00	3,00	0,513
		40%	1,00	2,00	3,00	
	beija-flor E ₅	20%	1,00	1,00	2,00	0,0218*
		40%	1,00	1,00	2,00	
Exp. 03	beija-flor E ₆	20%	1,00	1,00	2,00	0,001*
		40%	1,00	1,00	2,00	
	beija-flor E ₇	20%	1,00	1,00	2,00	0,0813 **
		40%	1,00	1,00	2,00

Figura 03. “Boxplot” do número de bicadas por visita realizadas aos bebedouros contendo sacarose a 20% e 40% pelos beija-flores A₁, E₁, E₂, E₃, E₄, E₅, E₆ e E₇. Os limites inferior e superior do retângulo indicam, respectivamente, o quartil 25 e 75, a linha horizontal dentro do retângulo indica a mediana, as barras que partem do retângulo expressam as medidas máximas e mínimas e os asteriscos acima destas barras indicam os *outliers* da distribuição. Comparando os escores relativos entre as diferentes concentrações, os asteriscos simples (*) indicam diferenças significativas (Teste de Friedman, $p < 0,05$) e os asteriscos duplos (**) indicam uma tendência a diferenças significativas (Teste de Friedman, $0,10 < p < 0,05$).

Os gráficos da Figura 04 foram construídos para cada indivíduo a partir da sequência de visitas realizadas ao bebedouro com solução de sacarose a 20% ou ao bebedouro com solução a 40%, por dia de experimento. Levando-se em conta quantos dias a primeira, a segunda, a terceira, até a última visita de cada dia foi realizada a cada um dos bebedouros, o eixo y representa a frequência relativa de dias (número de dias/total de dias de experimento) em que as sucessivas visitas (eixo x) foram realizadas a um dos bebedouros contendo sacarose a 20% ou 40%. Observa-se para a maioria dos indivíduos (beija-flores A₁, E₁, E₃, E₆ e E₇) que o número de visitas realizadas à concentração 40% aumentou ao longo do dia, conseqüentemente, reduzindo-se para a concentração 20% (Regressão Linear, $p < 0,05$).

Figura 04. Legenda na próxima duas páginas.

Figura 04. Legenda na próxima página.

Figura 04. Frequência relativa de dias (número de dias/total de dias de experimento) em que as sucessivas visitas do dia foram realizadas aos bebedouros contendo solução de sacarose a 20% ou a 40% pelos beija-flores A₁, E₁, E₂, E₃, E₄, E₅, E₆ e E₇. As linhas contínuas e as linhas pontilhadas representam as regressões lineares das visitas aos bebedouros que ofereceram sacarose a 20% e 40%, respectivamente, com suas respectivas equações da reta; os asteriscos (*) indicam a significância das regressões lineares ($p < 0,05$).

2.4. Discussão

O presente conjunto de experimentos foi proposto com o intuito de verificar possíveis preferências por duas concentrações distintas de solução de sacarose (20% ou 40%) por duas espécies de beija-flores de ocorrência de nossa fauna brasileira (*Amazilia lactea* e *Eupetomena macroura*). Observou-se, para o exemplar de *A. lactea*, uma preferência clara pela maior concentração de solução de sacarose (40%) pela análise do número de visitas a cada solução oferecida (Tabela 05 e Figura 02); em relação aos exemplares de *E. macroura*, observou-se um maior número de visitas por dia à solução a 40% apenas para os indivíduos do terceiro experimento (Tabela 05 e Figura 02), provavelmente devido ao desenho experimental que favoreceu a observação da preferência por envolver um maior tempo de observação e menos troca de local de oferecimento das soluções. Interessantemente, a análise da sequência de visitas (Figura 04) mostrou que os animais tendem a visitar aleatoriamente um dos bebedouros no início do dia ($\pm 50\%$ das escolhas para cada solução), mas que, ao longo das sucessivas visitas, a maioria dos indivíduos tende a visitar em maior proporção o bebedouro com sacarose a 40%, ressaltando a preferência por essa maior concentração.

Conforme citado na introdução, existem dados conflitantes acerca deste tema na literatura; a maioria dos experimentos envolvendo concentrações distintas mostra uma preferência por concentrações acima das encontradas nas flores polinizadas pelos beija-flores.

A teoria do forrageamento ótimo prediz que modelos de otimização permitem prever o comportamento de forrageamento do animal, baseado na idéia de que o animal adota regras de decisão que maximizam sua taxa líquida de aquisição energética enquanto forrageia (PYKE, 1978). No caso do paradigma polinizador-planta, a teoria prediz que a concentração que maximiza a taxa de ganho energético do polinizador deveria corresponder à concentração do néctar oferecida pelas plantas por ele polinizadas, uma vez que as plantas deveriam oferecer ao polinizador o que ele prefere a fim de garantir a sua visita (ROBERTS, 1996). Acredita-se que a relação entre a demanda energética do polinizador e a qualidade do recurso alimentar oferecido pelas flores (concentração e quantidade) seja o principal fator que determina a permanência ou não do animal como visitante efetivo. Se o reforço alimentar é muito grande em relação à demanda energética, o visitante tende a restringir seus movimentos não se tornando, assim, um polinizador efetivo. Pelo contrário, se o reforço é relativamente

pequeno, o visitante aprende a evitar aquelas espécies vegetais e forrageiam em outras (ver revisão de HEINRICH, 1975).

O único estudo conhecido que envolveu espécies da fauna brasileira foi o de RUSCHI, em 1953, que estudou o comportamento alimentar de 23 espécies de beija-flores em campo aberto, inclusive *E. macroura*. O autor relatou uma preferência por soluções de sacarose na seguinte ordem: 20, 18, 15, 23, 25, 12, 30 e 10%, da concentração mais preferida à menos. Não foi detalhado em seu artigo se houve diferenças inter- ou intra-específicas entre os animais e nem foram disponibilizados dados estatísticos. O autor concluiu que as concentrações entre 15-25% seriam as preferidas pelos beija-flores por se aproximarem das concentrações encontradas nas flores por eles polinizadas.

De fato, observa-se que as flores polinizadas por beija-flores produzem néctar numa concentração média de açúcar de 20-25% (RUSCHI, 1953; BAKER, 1975; PYKE & WASER, 1981; McDADE & WEEKS, 2004; MENDONÇA & ANJOS, 2006); porém, em diversos testes de preferência por soluções em diferentes concentrações realizados com beija-flores de ocorrência do território norte-americano (*Archilochus alexandri*, *Calypte anna*, *Selasphorus platycercus*, *Selasphorus rufus*), têm-se mostrado preferência por concentrações bem acima de 20-25%, chegando a concentrações acima de 45% (VAN RIPER, 1958; HAINSWORTH & WOLF, 1976; STILES, 1976; PYKE & WASER, 1981, TAMM & GASS, 1986, ROBERTS, 1996), que corroboram com os resultados aqui obtidos. É provável que a estratégia experimental aqui adotada tenha permitido identificar, nesses animais de ocorrência do território brasileiro, a preferência pela maior concentração que a estratégia adotada por RUSCHI (1953).

Parece que de fato existe uma discrepância entre as concentrações de néctar encontradas nas flores polinizadas e as preferidas pelos beija-flores. Diversos modelos matemáticos têm sido propostos a fim de predizer qual seria a concentração ótima que maximizaria a sua taxa de aquisição de energia; observa-se, porém, que cada modelo leva em conta diferentes parâmetros em sua análise, chegando a valores bastante divergentes. Por exemplo, HEYNEMAN (1983) previu uma concentração ótima próxima a 26% ao levar em conta que o néctar é obtido por capilaridade pela língua dos beija-flores e que a viscosidade de uma solução é diretamente proporcional à sua concentração; soluções mais concentradas resultariam, então, em taxas de aquisição de energia menores ao reduzir a taxa de tomada de néctar. Já TAMM e GASS (1986), baseados na taxa de aquisição de volume instantâneo (obtido em apenas uma lambida

do animal – note que numa bicada pode haver várias lambidas), que diminui com o aumento da concentração da solução devido ao crescente aumento da sua viscosidade, calcularam uma concentração ótima de 40-50% para uma taxa máxima de aquisição de energia instantânea. Outros autores, ao adicionar ao cálculo o parâmetro volume de néctar consumido, encontraram uma concentração ótima de 20-25% para volumes pequenos de néctar, que podem ser consumidos em apenas uma lambida, e de 35-45% para volumes grandes, que requerem muitas lambidas, devido ao custo energético adicional de realizar muitas lambidas que seria, então, compensado com uma maior concentração de açúcar (KINGSOLVER & DANIEL, 1983); segundo esses autores, os resultados explicariam tanto as concentrações de néctar encontradas em flores visitadas por beija-flores quanto as altas concentrações preferidas em testes de escolha, uma vez que as plantas oferecem volumes de néctar na ordem de microlitros, em média de 10-15 μL (PETIT & FREEMAN, 1997; FREITAS & SAZIMA, 2001), que podem ser consumidos em apenas uma lambida. Já na maioria dos testes de escolha, como os anteriormente citados e nos aqui realizados, são oferecidos grandes volumes de néctar, que possibilitam os animais realizarem muitas lambidas. De fato, encontrou-se em alguns dos exemplares aqui testados um número significativamente maior de bicadas por visita (note que o número de lambidas não foi mensurado nos experimentos, mas cada bicada pode envolver muitas lambidas) aos bebedouros com solução a 40% (Tabela 06 e Figura 03), o que corroboraria com tal hipótese. Porém, ROBERTS (1996), ao oferecer diferentes concentrações de solução de sacarose em volumes semelhantes aos encontrados nas flores visitadas por beija-flores, continuou encontrando preferências pelas maiores concentrações oferecidas; provavelmente, o fato de alguns dos animais aqui testados realizarem um maior número de bicadas por visita à maior concentração seria, então, melhor explicado como um indicativo da sua preferência por essa solução.

Considerando que os beija-flores se comportam como maximizadores de energia durante seu forrageamento (MONTGOMERIE *et al.*, 1984; HOUSTON & KRAKAUER, 1993) e que a concentração preferida pelos beija-flores é a concentração que maximiza a sua taxa de aquisição de energia (ROBERTS, 1996), podemos afirmar que a concentração de néctar oferecida pelas plantas polinizadas pelos beija-flores está abaixo do ótimo para esses animais e que, portanto, outros fatores, que não somente a aptidão (*fitness*) dos beija-flores, devem ser levados em conta. De fato, os modelos que tentam prever qual seria a concentração ótima para uma aquisição energética

maximizada, além de controversos, consideram somente os parâmetros dos beija-flores, em detrimento ao das plantas.

PYKE e WASER (1981) defendem que no balanço polinizador-planta, a aptidão das plantas também deve ser considerada. Estes propuseram que as plantas não são unicamente afetadas pelas visitas dos polinizadores, mas também pela quantidade de energia gasta na produção de néctar e, o néctar diluído, além de representar um menor gasto energético, forçaria a visita dos beija-flores em muitas outras flores para obtenção da energia necessária, aumentando assim a probabilidade de polinização cruzada. HEINRICH & RAVEN (1972) apontaram que não seria vantajoso a uma população de plantas, que depende da polinização cruzada para a viabilidade de suas sementes, que um único indivíduo satisfaça o seu visitante por completo. O açúcar seria mais eficientemente utilizado se apresentado numa quantidade (ou concentração) para atrair e segurar a atenção do polinizador em potencial, mas em quantidade eficientemente pequena para forçar o polinizador a visitar outras plantas de mesma espécie.

Já BOLTON & FEINSINGER (1978) sugeriram que a baixa concentração de açúcar nos néctares produzidos em muitas das flores polinizadas por beija-flores evitaria sua utilização por abelhas, que seriam polinizadoras menos eficazes. As abelhas de várias espécies demonstram preferência por néctares concentrados (HEINRICH, 1975) assim como os beija-flores, mas estas seriam incapazes de tirar proveito energético de néctares muito diluídos, pois a energia gasta na evaporação do excesso de água para produção de mel a partir de soluções com concentrações próximas a 20% passa a ser maior que o ganho (FREE, 1970 *apud* BOLTON & FEINSINGER, 1978).

PLOWRIGHT (1985) verificou que a concentração do néctar nas flores de nove espécies estudadas é inversamente proporcional ao comprimento da sua corola e especulou que a baixa concentração encontrada em flores polinizadas por beija-flores seria uma consequência secundária, sem valor adaptativo, resultado da consequência adaptativa primária de possuir uma longa corola como forma de evitar que polinizadores não efetivos consumam o recurso oferecido. A baixa concentração seria então explicada pela baixa taxa de evaporação da água do néctar que estaria protegido pela longa corola e seria compensada pelo maior volume oferecido. Apesar de PYKE & WASER (1981) não terem encontrado correlação significativa entre a concentração do néctar e comprimento da corola em um estudo de campo em mais de 21 espécies vegetais da Costa Rica, PLOWRIGHT (1985) rebateu argumentando que esses autores não levaram

em conta parâmetros físicos ambientais, como a temperatura e a umidade relativa do ar, o que poderiam estar influenciando nos resultados.

Ao considerar que, as baixas concentrações de néctar oferecidas pelas flores, mesmo que em volumes grandes, resultariam num déficit energético e perda de massa corpórea pelos beija-flores, SUAREZ & GASS (2002) sugeriram que tanto o comportamento quanto o funcionamento de diversos órgãos dos beija-flores, como dos rins, devem estar envolvidos no estabelecimento de limites superiores das taxas de aquisição e assim, maximizando o seu ganho líquido.

A determinação da concentração do néctar oferecido pelas plantas é provavelmente resultado da interação destes e outros fatores, que permanecem para serem determinados. Do ponto de vista evolutivo, a estreita relação entre planta-polinizador pode ser então entendida a partir de uma perspectiva de custos e benefícios, obviamente balanceada entre os beija-flores e suas plantas. E, por isso, modelos e teorias falham ao tentar prever parâmetros apenas do ponto de vista do polinizador ou da planta.

Vale a pena ressaltar que, independente da interessante discussão acerca das concentrações de açúcar preferidas pelos beija-flores e as encontradas em seu principal alimento, o presente conjunto de resultados nos permitiu observar que esses animais, além de demonstrarem acuidade para diferenciar qualidades alimentares distintas (“o quê”) são capazes de associá-las a localizações espaciais específicas (“onde”), se utilizando destas informações para guiar suas visitas subseqüentes, exibindo dois dos aspectos fundamentais do processamento de uma memória do tipo-episódica, conforme discutido anteriormente.

Capítulo 03. Memória Espacial em Beija-Flores

3.1. Introdução

A distribuição do alimento no território de um animal reflete parcialmente a sua própria atividade, uma vez que o comportamento de forrageamento resulta numa disponibilidade de alimento temporariamente menor no local recentemente explorado, adicionando complexidade na distribuição e abundância de alimento. Portanto, se durante o forrageamento, o animal interfere na disponibilidade do reforço de modo a criar novos padrões espaciais de distribuição que sejam lembrados e explorados num turno subsequente de forrageamento, isto pode vir a aumentar sua eficiência total de aquisição de alimento (BAUM & GRANT, 2001). Possivelmente, os forrageadores se lembram de fontes alimentares recentemente visitadas em mais de uma escala espaço-temporal (GASS & MONTGOMERIE, 1981), incluindo uma memória de longa duração para a lembrança dos últimos campos visitados (do inglês *patches*, que representam unidades alimentares visitadas a cada surto de forrageamento) e uma memória de curta duração para a lembrança das flores visitadas dentro do campo que ainda está sendo explorado (ARMSTRONG *et al.*, 1987).

Os beija-flores provavelmente percebem seu ambiente numa hierarquia de escalas; seu principal alimento, o néctar, varia espacialmente – se apresentando em flores individuais, em inflorescências, campos de flores e até habitats de agregados de campos de flores - e temporalmente – ao longo do ano, com diferentes épocas de floração das espécies e, ao longo do dia, dependendo do padrão de consumo e taxa de renovação de néctar da flor (BAUM & GRANT, 2001). Acredita-se que uma memória espacial apurada seja um importante componente adaptativo dos beija-flores, sendo crucial para a manutenção de seus requerimentos energéticos diários. Estes animais visitam centenas de flores a cada dia e certamente se beneficiariam se lembrassem das localizações das mesmas, evitando revisitas a flores recentemente esvaziadas e retornando às mesmas apenas após a reposição do néctar.

Diversos estudos envolvendo aprendizagem e memória têm mostrado que beija-flores são capazes de utilizar tanto da localização espacial quanto de pistas intrínsecas (como a cor ou padrão de cores) de alimentadores artificiais, na aprendizagem de diferentes tarefas (COLLIAS & COLLIAS, 1968; MILLER & MILLER, 1971; COLE *et al.*, 1982; MILLER *et al.*, 1985; BROWN & GASS, 1993; HURLY, 1995; SUTHERLAND & GASS, 1995; HURLY & HEALY, 1996; 2002). Especula-se que, em situações naturais, a orientação espacial seja utilizada na discriminação de flores

recentemente visitadas e para o retorno em visitas subseqüentes, quando passado o tempo de reposição do néctar, e que pistas intrínsecas de flores sejam utilizadas pelos beija-flores na distinção dentre flores com recompensa diferencial de néctar ou na generalização de flores para a procura em novos locais (MILLER *et al.*, 1985; BROWN & GASS, 1993; HURLY & HEALY, 1996).

Generalização pode ser entendida como a capacidade do animal de utilizar a feição de um objeto, como por exemplo, sua forma ou cor, na procura pelo mesmo recurso em objetos que possuem essas características. A capacidade de generalizar poderia então ser avaliada em beija-flores em tarefas que manipulam a localização e cores de bebedouros, por exemplo, reforçando apenas uma das cores num grupo de alimentadores coloridos.

O objetivo desta série de experimentos foi avaliar como o beija-flor *E. macroura* lida com tarefas que manipulam a posição de oito bebedouros artificiais, na presença e ausência de pistas intrínsecas, numa tarefa análoga ao labirinto radial de oito braços, aparelho utilizado na avaliação da memória espacial em ratos (OLTON & SAMUELSON, 1976).

3.2. Materiais e Métodos

Três experimentos de manipulação da distribuição espacial de alimento foram realizados com beija-flores da espécie *E. macroura*. Todos os experimentos envolveram o oferecimento de oito bebedouros artificiais – cilindros de acrílico com 3,2 cm de diâmetro e 5,0 cm de comprimento, com um disco colorido fixado na frente e um orifício central de 03 mm de diâmetro para a obtenção do alimento pelo animal – dispostos octogonalmente em um painel de 1,0 x 1,0 m. Reforço (solução de sacarose a 20% ou solução de Kiko Nectar a 11%) era oferecido em quatro dos bebedouros e no restante dos bebedouros era oferecida água, sendo que a disposição espacial dos bebedouros variava aleatoriamente a cada dia.

Os dois primeiros experimentos envolveram o oferecimento de bebedouros visualmente idênticos, sendo que o primeiro foi desenvolvido com um indivíduo em cativeiro e o segundo com um indivíduo em campo aberto. O terceiro experimento envolveu três indivíduos em campo aberto e o oferecimento de bebedouros visualmente distintos, quatro amarelos e quatro vermelhos, com o reforço associado aleatoriamente a uma das cores a cada dia. Nos experimentos desenvolvidos em campo aberto, os indivíduos foram identificados por diferenças específicas de suas penas, cujas visitas eram monitoradas pela gravação diária dos bebedouros.

Os indivíduos de *E. macroura* dos Experimentos 04 e 05 foram identificados, respectivamente, por beija-flores E₈ e E₉, e os indivíduos do Experimento 06 por beija-flores E₁₀, E₁₁ e E₁₂. Analisou-se o número e a seqüência de visitas por dia e a porcentagem de dias em que os 4, 3, 2, 1 ou nenhum dos bebedouros reforçados ou não reforçados receberam visitas durante o dia.

a) Experimento 04 – Memória Espacial: Teste em Cativeiro

Para este experimento foi construída uma gaiola de 1,0 x 1,0 x 3,0 m de tela para a manutenção em cativeiro de um indivíduo de *E. macroura* (beija-flor E₈) em uma sala do próprio Laboratório de Neurociências e Comportamento, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, SP. O painel verde com os bebedouros amarelos visualmente idênticos (Figura 05a) foi acoplado em uma das paredes da gaiola e possibilitava a manipulação dos bebedouros externamente. Sob cada bebedouro se encontrava um fotosensor de luz difusa sensível ao infravermelho (Figura 05b) que,

conectado ao computador, permitia registrar as visitas do beija-flor. O teste teve duração de 19 dias (do dia 04 a 22 de outubro de 2003) e o reforço, associado a apenas quatro bebedouros a cada dia, consistia de alimento para beija-flor Kiko Nectar a 11 %.

Figura 05. a) Foto do painel mostrando a distribuição espacial dos bebedouros e sensores e; b) foto do bebedouro e sensor infravermelho, em detalhe.

b) Experimento 05 – Memória Espacial: Teste em Campo Aberto.

Este experimento foi realizado no Bairro de Campo Belo, São Paulo, e envolveu uma manipulação semelhante ao experimento anterior; porém, um painel cinza foi utilizado com os oito bebedouros amarelos visualmente idênticos e disponibilizado em campo aberto. O reforço, oferecido em apenas quatro dos bebedouros a cada dia, consistia de solução de sacarose a 20 %.

Apenas um indivíduo de *E. macroura* visitando o painel rotineiramente foi identificado (beija-flor E₉). As visitas foram monitoradas pela gravação diária do painel das 06:00 às 20:00 h, num total de 19 dias de teste (entre os dias 01 e 19 de fevereiro de 2004).

c) Experimento 06 - Memória Espacial com o uso de Pistas Intrínsecas: Teste em Campo Aberto

Este experimento também foi realizado no Bairro de Campo Belo, São Paulo; porém, no painel cinza foram disponibilizados quatro bebedouros amarelos e quatro vermelhos, também em campo aberto. O reforço, associado a uma das cores em cada dia, variando aleatoriamente ao longo de dias sucessivos, consistia de solução de sacarose a 20 %.

Identificou-se três indivíduos de *E. macroura* visitando o painel rotineiramente (beija-flores E₁₀, E₁₁ e E₁₂). As visitas foram monitoradas pela gravação diária do painel das 06:00 às 20:00 h, num total de 26 dias de teste (dos dias 02 a 27 de março de 2004).

3.3. Resultados

A análise do número de visitas por dia mostra que todos os beija-flores, dos três experimentos, realizaram um número significativamente maior de visitas totais por dia aos bebedouros reforçados do que aos não reforçados (Teste de Friedman, $p < 0,001$) e um número significativamente maior de visitas por dia a cada um dos bebedouros reforçados do que a cada não reforçado (Teste de Friedman, $p < 0,001$) (Tabela 07 e Figura 06).

Tabela 07. Medianas e intervalos interquartis (quartil 25 e quartil 75) do número total de visitas realizadas aos bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) por dia; mediana e intervalos interquartis do número total de visitas realizadas a cada um dos bebedouros reforçados e não reforçados por dia, e as significâncias estatísticas (Teste de Friedman, p-valor) das comparações entre os escores relativos aos diferentes bebedouros pelos beija-flores E₈, E₉, E₁₀, E₁₁ e E₁₂. Os asteriscos simples (*) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

			visitas/dia			signif.	visitas/bebedouro/dia			signif.
			Q25	mediana	Q75	p	Q25	mediana	Q75	p-valor
Exp. 04	BF E ₈	R	89,00	114,00	138,00	< 0,001 *	10,00	20,00	40,75	< 0,001 *
		NR	30,00	42,00	48,00		3,25	8,00	14,75	
Exp. 05	BF E ₉	R	79,00	89,00	96,00	< 0,001 *	7,00	16,50	32,00	< 0,001 *
		NR	20,00	31,00	37,00		2,00	5,00	8,00	
Exp. 06	BF E ₁₀	R	20,75	25,50	33,50	< 0,001 *	3,25	6,00	10,75	< 0,001 *
		NR	2,00	3,00	5,00		0,00	1,00	1,00	
	BF E ₁₁	R	13,75	17,00	28,50	< 0,001 *	3,00	4,00	6,75	< 0,001 *
		NR	1,75	2,50	5,00		0,00	1,00	1,00	
	BF E ₁₂	R	14,00	22,50	34,25	< 0,001 *	2,00	5,00	9,00	< 0,001 *
		NR	1,00	3,00	7,00		0,00	1,00	1,75

Figura 06. A) “Boxplot” do número de visitas realizadas aos bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) por dia, e B) “boxplot” do número de visitas realizadas a cada um dos bebedouros reforçados e não reforçados por dia pelos beija-flores E₈, E₉, E₁₀, E₁₁ e E₁₂. Os limites inferior e superior do retângulo indicam, respectivamente, o quartil 25 e 75, a linha horizontal dentro do retângulo indica a mediana, as barras que partem do retângulo expressam as medidas máximas e mínimas e os asteriscos acima destas barras indicam os *outliers* da distribuição. Comparando os escores relativos aos diferentes bebedouros por indivíduo, os asteriscos simples (*) indicam as diferenças significativas do Teste de Friedman ($p < 0,001$).

Observa-se, ainda, para os beija-flores do Experimento 06 (E_{10} , E_{11} e E_{12}) um aumento significativo nas frequências relativas de visitas por dia aos bebedouros reforçados (visitas aos bebedouros reforçados/total de visitas por dia) e, conseqüente queda na frequência relativa de visitas aos bebedouros não reforçados (= 1- frequência relativa de visitas aos bebedouros reforçados) ao longo dos dias de experimento (Teste de Friedman, $p < 0,05$); o mesmo não foi observado para os beija-flores dos Experimentos 04 e 05 (E_8 e E_9), que não mostraram aumentos significativos nas frequências relativas de visitas por dia aos bebedouros reforçados ao longo dos dias de experimento (Teste de Friedman, $p = 0,301$); ao contrário, o indivíduo E_8 apresentou uma queda significativa nesta frequência relativa de visitas aos bebedouros reforçados (Regressão Linear, $p < 0,05$) (Figura 07).

Figura 07. Legenda na próxima página.

Figura 07. Frequência relativa de visitas (número de visitas /total de visitas por dia) aos bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) ao longo dos dias de experimento para os beija-flores E₈, E₉, E₁₀, E₁₁ e E₁₂. As linhas contínuas e pontilhadas representam as regressões lineares das visitas aos bebedouros reforçados e não reforçados, respectivamente, com suas Equações da Reta. Os asteriscos (*) indicam a significância das regressões ($p < 0,001$).

Animais expostos a manipulações experimentais diferentes, particularmente a presença (Experimentos 04 e 05) ou não (Experimento 06) de cores distintas dos bebedouros reforçados e não reforçados, não exibiram diferenças significativas entre si em relação à frequência relativa de visitas por dia aos bebedouros reforçados e não reforçados. Ou seja, os beija-flores E₈ e E₉, dos Experimentos 04 e 05, não apresentaram diferenças significativas entre si na frequência relativa de visitas por dia aos bebedouros reforçados e não reforçados ao longo dos dias (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,194$) e o mesmo foi detectado entre os beija-flores E₁₀, E₁₁ e E₁₂ do Experimento 06 (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,981$). Interessantemente, ao se comparar essa mesma frequência relativa de visitas, agora entre os indivíduos das diferentes manipulações experimentais (Experimento 04 e 05 x Experimento 06), observa-se uma diferença significativa entre os beija-flores E₁₀, E₁₁ e E₁₂ e os beija-flores E₈ e E₉ (Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,001$). A Figura 08 mostra o “*boxplot*” das frequências relativas de visitas por dia aos bebedouros reforçados e não reforçados por beija-flor, evidenciando as diferenças entre as visitas aos bebedouros reforçados e não reforçados por animal e as diferenças entre os beija-flores das manipulações experimentais distintas, indicando que os beija-flores E₁₀, E₁₁ e E₁₂, do Experimento 06, em que se apresentou bebedouros de cores diferentes, realizaram relativamente menos visitas aos bebedouros não reforçados por dia (frequência relativa de visitas aos bebedouros não reforçados por dia) que os beija-flores E₈ e E₉, dos Experimentos 04 e 05, em que se apresentaram bebedouros todos da mesma cor.

Figura 08. “Boxplot” das frequências relativas de visitas por dia (número de visitas/total de visitas por dia) aos bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) pelos beija-flores E₈, E₉, E₁₀, E₁₁ e E₁₂. Os limites inferior e superior do retângulo indicam, respectivamente, o quartil 25 e 75, a linha horizontal dentro do retângulo indica a mediana, as barras que partem do retângulo expressam as medidas máximas e mínimas e os asteriscos acima ou abaixo destas barras indicam os *outliers* da distribuição. O asterisco simples (*) sobre os gráficos indicam diferença significativa entre os animais das diferentes manipulações experimentais (Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,001$).

A Figura 09 mostra a frequência relativa de dias em função das visitas sucessivas ao longo do dia para cada indivíduo, a partir da sequência de visitas realizadas aos bebedouros reforçados e aos não reforçados por dia. Levando-se em conta o número de dias em que a primeira, a segunda, a terceira, até a última visita de cada dia foi realizada a cada um dos bebedouros, o eixo y representa a frequência relativa de dias (número de dias/total de dias de experimento) em que as sucessivas visitas (eixo x) foram realizadas a um bebedouro reforçado ou não reforçado. Observa-se, para todos os indivíduos, um aumento significativo de visitas aos bebedouros reforçados e conseqüente diminuição aos não reforçados no decorrer das visitas do dia (Regressão Linear, $p < 0,001$, para os indivíduos E_8 e E_9 e, Regressão Logarítmica, $p < 0,001$, para os indivíduos E_{10} , E_{11} e E_{12}). Ressalta-se que a Regressão que melhor se ajusta aos resultados varia entre os indivíduos dos Experimentos 04 e 05 (Regressão Linear) e do Experimento 06 (Regressão Logarítmica), indicando que a presença ou ausência de cores distintas entre os bebedouros reforçados e não reforçados influenciam nas taxas de aquisição dos animais.

Figura 09. Legenda na próxima página.

Figura 09. Frequência relativa de dias (número de dias/total de dias de experimento) em que as sucessivas visitas do dia foram realizadas aos bebedouros reforçados ou não reforçados pelos beija-flores E₈, E₉, E₁₀, E₁₁ e E₁₂. As linhas contínuas e pontilhadas representam as regressões (lineares – beija-flores E₈ e E₉ ou logarítmicas – beija-flores E₁₀, E₁₁ e E₁₂) das visitas aos bebedouros reforçados e não reforçados, respectivamente, e suas Equações da Reta. Os asteriscos (*) indicam a significância das regressões ($p < 0,001$).

A representação apenas das primeiras visitas sucessivas de cada dia mostra claramente que para os indivíduos do Experimento 06 (E_{10} , E_{11} e E_{12}) a primeira visita de cada dia tende a ser aleatória a um dos tipos de bebedouros (reforçado ou não reforçados), mas já a partir da segunda visita do dia pode-se observar uma tendência de aumento de visitas aos bebedouros reforçados e conseqüente diminuição aos bebedouros não reforçados; para os indivíduos do Experimento 04 e 05 (E_8 , E_9), essa tendência passa a ser notada apenas a partir da 20ª visita em diante (Figura 10, note a diferença na escala das abscissas).

Figura 10. Legenda na próxima página.

Figura 10. Frequência relativa de dias (número de dias/total de dias de experimento) em que as 30 primeiras (Experimentos 04 e 05) ou as 10 primeiras (Experimento 06) visitas sucessivas dos dias foram realizadas aos bebedouros reforçados ou não reforçados pelos beija-flores E₈, E₉, E₁₀, E₁₁ e E₁₂. As linhas pontilhadas marcam as expectativas de frequências relativas aleatórias (0,5).

A análise da porcentagem de dias em que todos os quatro, ou apenas três, dois, um ou nenhum dos bebedouros reforçados ou não reforçados receberam visitas durante o dia (Tabela 08 e Figura 11) mostra que nos Experimentos 04 e 05 todos os quatro bebedouros reforçados e não reforçados foram visitados na maioria dos dias, enquanto que em apenas poucos dias apenas três ou dois deles receberam visitas pelos indivíduos E₈ e E₉. Já no Experimento 06 observa-se que todos os quatro bebedouros da cor reforçada receberam visitas na maioria dos dias, enquanto que apenas dois ou um dos bebedouros da cor não reforçada receberam visitas na maioria dos dias, sendo que houve dias em que nenhum desses bebedouros recebeu visitas pelos indivíduos E₁₀, E₁₁ e E₁₂. Estes resultados indicam claramente que, quando os animais devem basear-se apenas na posição relativa dos bebedouros para identificar os bebedouros com alimento, necessitam visitar a maioria dos bebedouros disponíveis para encontrar o reforço, já os animais que contam com a informação adicional “cor” se utilizam desta informação para generalizar quais os locais/bebedouros contém ou não reforço, visitando a maioria dos locais com reforço e evitando os locais sem reforço, mesmo sem terem visitado estes últimos.

Observa-se, ainda, na Figura 12, que o número de bebedouros não reforçados que recebeu visitas pelos beija-flores E₁₀, E₁₁ e E₁₂ decai ao longo dos dias (ANOVA, $p < 0,05$), indicando a aprendizagem ao longo dos dias de que a informação “cor” distinta dos bebedouros indica a presença ou ausência de alimento, passando a ser utilizada para generalizar quais os locais dos bebedouros reforçados do dia, evitando assim visitas aos locais/bebedouros não reforçados, mesmo sem tê-los visitados.

Tabela 08. Porcentagem de dias em que os 4, 3, 2, 1 ou nenhum dos bebedouros reforçados (R) ou não reforçados (NR) receberam visitas no dia pelos beija-flores E₈, E₉, E₁₀, E₁₁ e E₁₂.

n. bebedouros	Exp. 04		Exp. 05		Exp. 06					
	BF E ₈		BF E ₉		BF E ₁₀		BF E ₁₁		BF E ₁₂	
	R (%)	NR (%)	R (%)	NR (%)	R (%)	NR (%)	R (%)	NR (%)	R (%)	NR (%)
0	0	0	0	0	0	7,69	0	3,85	0	7,69
1	0	0	0	0	0	3,85	0	23,08	0	30,77
2	5,26	5,26	10,53	10,53	0	53,85	3,85	30,77	0	15,38
3	15,79	21,05	5,26	10,53	15,38	23,08	7,69	26,92	15,38	26,92
4	78,95	73,68	84,21	78,95	84,62	11,54	88,46	15,38	84,62	19,23

Figura 11. Porcentagem de dias em que os 4, 3, 2, 1 ou nenhum dos bebedouros reforçados (R) ou não reforçados (NR) receberam visitas por dia pelos beija-flores E₈, E₉, E₁₀, E₁₁ e E₁₂.

Figura 12. Média de quantos dentre os quatro bebedouros não reforçados (NR) receberam visitas por dia ao longo dos dias pelos beija-flores E₁₀, E₁₁ e E₁₂. A linha representa a Regressão Linear dos dados com sua respectiva Equação da Reta e o asterisco (*) indica a significância da Regressão ($p < 0,05$).

Avaliou-se a possibilidade dos animais modularem suas escolhas presentes com base em sua experiência do dia anterior. Analisando-se apenas as primeiras visitas de cada dia em função dos parâmetros do dia anterior, observou-se para os beija-flores E₈ e E₉, dos Experimentos 04 e 05, que não houve tendência, nas primeiras visitas de cada dia de se direcionarem ao local do bebedouro reforçado ou não reforçado do dia anterior (Figura 13A), indicando que as informações do dia anterior não estavam sendo utilizadas pelos animais para dirigir suas visitas presentes. Já os beija-flores E₁₀, E₁₁ e E₁₂, do Experimento 06, podiam se basear em informações de cor, local ou de cor e local dos dias anteriores para guiar suas visitas presentes; porém, não fica clara preferência dos animais por um desses elementos para direcionarem suas escolhas (Figura 13B). Como a cada dia de experimento variavam-se as posições relativas e/ou a cor dos bebedouros reforçados e não reforçados, manter essas informações para o dia seguinte não seria benéfico para os animais.

Figura 13. A) Frequência relativa das primeiras visitas (quantidade de primeiras visitas /visitas totais) ao local do bebedouro reforçado (R) ou não reforçado (NR) do dia anterior pelos beija-flores E_8 e E_9 (Experimentos 04 e 05) e B) frequência relativa das primeiras visitas (quantidade de primeiras visitas /visitas totais) ao local ou à cor, ou ao local e à cor ou nenhum desses parâmetros do bebedouro reforçado (R) do dia anterior pelos beija-flores E_{10} , E_{11} e E_{12} (Experimento 06). As linhas pontilhadas marcam as expectativas de frequências relativas aleatórias.

3.4. Discussão

Os resultados do presente conjunto de experimentos mostram que animais da espécie *Eupetomena macroura* são capazes de lembrar a localização (“onde”) de bebedouros reforçados e não-reforçados (“o quê”) visualmente idênticos (Experimentos 04 e 05), visitando preferencialmente os locais reforçados e atualizando esta informação a cada dia. Na presença de pistas intrínsecas (“o quê”), i.e., com diferentes cores associadas aos locais (“onde”) do alimento (Experimento 06), os animais realizam relativamente menos erros por dia que os animais que lidaram com bebedouros iguais, apresentam uma queda na frequência relativa de erros (visitas aos bebedouros não reforçados/visitas totais por dia) ao longo dos dias e, na maioria dos dias, não visitam todos os bebedouros disponíveis da cor não reforçada, diferentemente dos animais dos Experimentos 04 e 05 que, na maioria dos dias, visitam todos os bebedouros disponíveis não reforçados. Isso faz todo o sentido. Considerando que esses últimos animais se orientam apenas pelo local dos bebedouros, há a necessidade destes visitarem os vários locais a cada dia para identificar aqueles que são reforçados. Assim, a estratégia no início é visitar todos os locais e, uma vez encontrado o alimento, focalizar suas visitas nestes locais. Já os animais do Experimento 06 adotam uma estratégia diferente; ao contar com informações adicionais (as cores diferenciadas), são capazes de, a partir de poucas visitas ou eventualmente apenas uma, generalizar quais os bebedouros reforçados do dia, diminuindo a quantidade de bebedouros não reforçados visitados por dia e melhorando seu desempenho ao longo do experimento. Estes resultados indicam que além dos beija-flores manterem a informação sobre os bebedouros reforçados ao longo de um dia de experimento, mantêm uma memória de longa duração das experiências dos dias anteriores.

Segundo O’KEEFE & NADEL (1978) a aprendizagem sobre locais pode envolver diferentes estratégias, incluindo (1) guiar-se usando o eixo egocêntrico i.e., tomando como referência a si próprio realizando rotações de ângulos específicos a direita, a esquerda, seguindo reto ou retornando; (2) valer-se de uma pista conspícua olfativa, visual, auditiva, ou tátil que é usada como referência para a orientação ou (3) aprender as relações espaciais que existem entre os objetos do ambiente e utilizar essas relações para formar um mapa aloentríco (ou mapa cognitivo) que é utilizado para encontrar o local desejado.

É provável que essas diferentes estratégias tenham sido utilizadas na resolução dos problemas desta série de experimentos realizados beija-flores da espécie *E. macroura*, incluindo o uso de um mapa cognitivo para retornar ao local onde se situavam os bebedouros, seu eixo egocêntrico e/ou um mapa cognitivo para lembrar as posições relativas dos bebedouros reforçados e não-reforçados e o uso de uma pista conspícua, no caso a cor dos bebedouros, para lembrar quais os reforçados num dado dia, para os animais do Experimento 06.

De fato, experimentos envolvendo animais de outras espécies de beija-flores - *Archilochus colubri*, *A. alexandri*, *Calypte anna*, *Eugene fulgens*, *Lampornis clemencie* e *Selasphorus rufus* – em que se manipulou entre 02 e 64 alimentadores artificiais visualmente idênticos, em diferentes padrões de distribuição espacial, demonstraram que estes também aprendem a retornar a bebedouros reforçados dentre outros não-reforçados, utilizando apenas como pista a sua disposição espacial (MILLER & MILLER, 1971; COLE *et al.*, 1982; MILLER *et al.*, 1985; BROWN & GASS, 1993; HURLY, 1995; SUTHERLAND & GASS, 1995). Por outro lado, em testes nos quais são utilizadas pistas intrínsecas dos bebedouros, como a cor ou padrão de cores dos mesmos, dissociadas da disposição espacial do reforço (por exemplo, oferecendo reforço associado a uma das cores dentre bebedouros de diferentes cores, mas trocando sua localização a cada novo surto de visitas), observa-se que esses animais aprendem a utilizar apenas essas pistas intrínsecas para retornar a um único bebedouro reforçado dentre outros não reforçados, apesar de, inicialmente, tenderem a responder preferencialmente à disposição espacial, não sendo encontradas evidências de que pistas de natureza intrínsecas seriam utilizadas prontamente na lembrança de bebedouros recompensados desigualmente (COLLIAS & COLLIAS, 1968; MILLER & MILLER, 1971; MILLER *et al.*, 1985; BROWN & GASS, 1993). Baseado nestes resultados especula-se que as pistas intrínsecas seriam utilizadas para facilitar a distinção inicial dentre os bebedouros, o que explicaria a aprendizagem mais rápida, mas para as visitas subseqüentes, utilizar-se-ia a lembrança das informações espaciais previamente disponíveis (COLLIAS & COLLIAS, 1968; HURLY & HEALY, 1996; 2002; MILLER & MILLER, 1971; MILLER *et al.*, 1985).

Nos experimentos citados anteriormente, os testes se limitavam a duas fases, uma primeira para a aquisição da informação e uma segunda para avaliação da aprendizagem na qual poderiam ocorrer as manipulações, com a manutenção ou a troca dos padrões de distribuição espacial e cores em relação à primeira fase. O presente

estudo analisou o comportamento alimentar dos indivíduos por vários dias consecutivos e mantendo-se as posições e cores dos bebedouros reforçados e não reforçados fixas a cada dia, trocando-as apenas no dia seguinte. Portanto, os beija-flores do Experimento 06 confrontavam-se a cada dia com uma nova disposição espacial e cor reforçada, podendo se guiar tanto pelas posições quanto pelas cores na diferenciação dentre os bebedouros reforçados e não reforçados. Pode-se dizer que a utilização de pistas intrínsecas deve compor uma importante capacidade no comportamento de forrageamento dos beija-flores, seja na procura por novas fontes alimentares e na generalização de quais flores oferecem ou não recompensas, seja em conjunto com as pistas espaciais, na lembrança das flores recentemente visitadas. HEALY & HURLY (1998) argumentaram que os animais somente se lembrariam e se utilizariam de informações visuais quando requisitadas e a vantagem seria uma redução no processamento neural, representando tanto uma economia de tempo quanto energética. Aqui, o uso das cores como informação se mostrou bastante útil para a resolução da tarefa em questão, ao reduzir substancialmente o número de visitas não recompensadas desde os primeiros dias de experimento, sendo provavelmente utilizadas como informação relevante.

A utilização ou não de pistas espaciais e/ou intrínsecas dos recursos alimentares deve depender de alguns fatores, mas o principal deve ser o quão redundante são essas informações para os beija-flores. Por exemplo, na ausência de cores discriminativas, os animais são “forçados” a basear-se apenas na informação espacial, mas, com a disponibilização de cores distintas, aprendem a se basear nestas pistas para encontrar alimento, estratégia que possibilita explorar mais eficientemente os recursos alimentares uma vez que são necessárias menos visitas para extrair a informação crítica da disponibilidade do reforço.

Capítulo 04. Memória Espaço-Temporal

4.1. Introdução

A memória espaço-temporal reflete a habilidade de um animal em representar conjuntamente aspectos espaciais e temporais de um evento (PETRUSO *et al.*, 2007). Neste tipo de aprendizagem o organismo não raro estabelece uma associação entre um evento biologicamente significativo (por exemplo, disponibilidade de alimento) e sua localização espacial em determinada hora do dia.

Acredita-se que a capacidade de processar conjuntamente aspectos espaciais e temporais de recursos alimentares represente uma importante capacidade evolutiva dos beija-flores, uma vez que seu principal recurso alimentar, o néctar das flores, se encontra espaço-temporalmente distribuído em seu território, apresentando variações quanto ao local das espécies vegetais em floração, quanto à quantidade e qualidade do recurso e, quanto à hora da disponibilidade e taxa de renovação do néctar.

A aprendizagem do tipo espaço-temporal seria resultado da interação dos sistemas de memória com os sistemas controladores dos ritmos biológicos. Os ritmos biológicos, que se caracterizam pela recorrência de eventos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais, manifestam-se num amplo espectro de frequências, com períodos que variam de 1 s (EEG), 90 minutos (estágios do sono), 24 h (ciclo sono-vigília), 28 dias (ciclo menstrual), até 365 dias (hibernação). Os mais estudados e melhor compreendidos até o momento são aqueles com período de aproximadamente 24 h, os chamados ritmos circadianos (TUREK *et al.*, 1994). Por sua própria natureza, depreende-se que sistemas biológicos de temporização sejam capazes de influenciar a atividade de todos os demais sistemas fisiológicos do organismo.

Do ponto de vista evolutivo são evidentes as vantagens de uma interação entre os sistemas de memória e dos ritmos biológicos na produção do comportamento adaptativo, isto permite ao organismo ajustar seu comportamento não só aos sincronizadores ambientais que se repetem irremediavelmente sempre na mesma fase, mas também a outros tipos de regularidades ambientais que surgem e se mantêm por determinados intervalos de tempo (levando à aquisição de uma associação local-hora por certo período de tempo), mas que podem desaparecer, pois fontes de alimento se esgotam (levando à extinção da resposta) e reaparecer em outro local e hora, já que novas fontes de alimentos podem ser encontradas (levando à aprendizagem de uma nova associação local-hora) e inclusive estabelecer várias associações simultaneamente, ou seja, visitar vários locais em diferentes horários.

Este tipo de memória vem sendo demonstrado em diferentes grupos filogenéticos; nos insetos sociais, em abelhas (MOORE-EDE *et al.*, 1982, MOORE, 2001) e formigas (SCHATZ *et al.*, 1999); nos mamíferos, em ratos (MISTLLBERGER *et al.*, 1996); nos peixes (REEBS, 1996, 1999; GÓMEZ-LAPLAZA & MORGAN, 2005); e em diferentes espécies de aves, como nos pombos, *Columbia livia* (WILKIE & WILLSON, 1992, 1995; SAKSIDA & WILKIE, 1994; WILKIE *et al.*, 1994), nos rouxinóis, *Sylvia borin* (BIEBACH *et al.*, 1989, 1994; KREBS & BIEBACH, 1989), nas gaivotas, *Larus spp.* (WILKIE *et al.*, 1996, 1997), nos estorninhos, *Sturnus vulgaris* (WENGER *et al.*, 1991) e nos tecelões, *Ploceus bicolor* (FALK *et al.*, 1992). Não temos notícias de estudos desse tipo em beija-flores.

O objetivo desta série de experimentos foi de avaliar se o beija-flor *E. macroura* é capaz de aprender associações envolvendo local da oferta de alimento e hora do dia, em testes que manipulam a presença de pistas intrínsecas e a distância relativa dos alimentadores.

4.2. Materiais e Métodos

Realizou-se três experimentos com beija-flores da espécie *Eupetomena macroura*, no Bairro Campo Belo da Cidade de São Paulo, que envolveram a manipulação da disponibilidade de alimento em horários distintos do dia. O primeiro, na presença de cores distintas dos alimentadores como sinalizador do local do alimento e os outros dois na ausência de cores distintas entre os alimentadores, mas manipulando-se sua distância relativa, um experimento com uma distância de 40 cm e o outro de 05 metros.

Para a atração inicial dos indivíduos, utilizou-se um bebedouro comercial contendo solução de sacarose a 20 % (Figura 14A); observadas visitas constantes, iniciava-se a fase de teste com dois bebedouros experimentais - tubos de plástico do tipo Falcon de 50 mL com uma flor de plástico vermelha, amarela ou branca fixada em sua extremidade – dispostos horizontalmente (Figura 14b).

O teste consistiu em dividir o dia em três horários: horário da manhã, das 06:00 às 10:00 h; intervalo, das 10:00 às 14:00 h; e horário da tarde, das 14:00 às 18:00 h. No horário da manhã, o reforço, solução de sacarose a 20 %, era oferecido em um dos bebedouros experimentais; no intervalo, ambos os bebedouros eram retirados e o bebedouro comercial era disponibilizado centralmente com sacarose 20 % suplementado com vitamina (VitaGold Potenciado Toruga); e no horário da tarde, os bebedouros experimentais retornavam e o reforço era oferecido no bebedouro oposto ao reforçado pela manhã.

A

B

Figura 14. A) Bebedouro comercial utilizado na atração inicial dos indivíduos e no intervalo entre os horários da manhã e tarde; B) bebedouros experimentais dispostos horizontalmente, mostrando uma flor vermelha e uma branca; as distâncias entre os bebedouros, de 40 cm ou 05 m, variam de acordo com o experimento.

Todos os experimentos foram desenvolvidos em campo aberto e os indivíduos identificados por diferenças específicas de suas penas, cujas visitas eram monitoradas pela gravação diária dos bebedouros. Identificou-se, no Experimento 07, quatro indivíduos visitando o local rotineiramente, que foram reconhecidos por E₁₃, E₁₄, E₁₅ e E₁₆; no Experimento 08, identificou-se três indivíduos, reconhecidos por E₁₇, E₁₈ e E₁₉; e no Experimento 09, três indivíduos foram identificados e reconhecidos por E₂₀, E₂₁ e E₂₂. Analisou-se o número, a sequência e as primeiras visitas por horário do dia.

A fim de avaliar a natureza da aprendizagem, foram realizados, após os dias de treinamento, Testes de Avaliação (“*Probe-Tests*”), a serem detalhados em cada experimento. Todos os Testes de Avaliação foram entremeados por tentativas na condição original da tarefa, a fim de evitar a extinção das respostas. Apenas as primeiras visitas do horário por indivíduo foram avaliadas.

a) Experimento 07 – Memória Temporal com o Uso de Pistas Intrínsecas

Este primeiro experimento envolveu disponibilizar dois bebedouros experimentais visualmente distintos, um branco à direita e um vermelho à esquerda, distantes em 40 cm horizontalmente, ao longo de 41 dias (do dia 01 de agosto ao dia 10 de setembro de 2006), sendo que no horário da manhã, o reforço era oferecido no bebedouro branco da direita e no horário da tarde, no bebedouro vermelho da esquerda. A Tabela 09 mostra o desenho experimental.

Tabela 09. Experimento 07 – Desenho experimental mostrando o intervalo com o bebedouro comercial, o bebedouro vermelho à esquerda não reforçado (NR) no horário da manhã e reforçado (R) no horário da tarde e, o bebedouro branco à direita reforçado no horário da manhã e não reforçado à tarde.

Horário Manhã: 06:00-10:00 h	Intervalo: 10:00-14:00 h	Horário Tarde: 14:00-18:00 h
vermelho NR branco R	sacarose 20 % + vitamina	vermelho R branco NR

O primeiro Teste de Avaliação revelou a estratégia adotada pelos animais na aprendizagem da tarefa. O teste envolveu a supressão da apresentação dos dois bebedouros em apenas um dos horários do dia; nesse horário houve oferta apenas do bebedouro comercial, mantendo-se a relação temporal previamente estabelecida (Tabelas 10 e 11, Teste de Avaliação 01a e 01b); assim, após a supressão da oferta dos bebedouros no horário anterior, se os animais direcionassem as suas visitas ao bebedouro reforçado do horário correspondente, poder-se-ia concluir que houve uma aprendizagem da relação reforço alimentar e horário do dia; se, ao contrário, direcionassem as suas visitas ao bebedouro não reforçado do horário mantido, concluir-se-ia que os animais adotaram uma estratégia não temporal, como a aprendizagem de uma sequência de oferecimento do reforço, como por exemplo, “bebedouro branco, depois vermelho, depois branco...” ou “bebedouro da direita, depois da esquerda, depois da direita...”. Cada horário, manhã e tarde, foi suprimido por duas vezes, totalizando quatro horários analisados.

Tabela 10. Teste de Avaliação 01a - Horário da Manhã (dia n), mostrando a supressão da oferta dos dois bebedouros do horário da tarde do dia anterior ($n-1$) e os bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) por horário.

Dia	Horário Manhã: 06:00-10:00 h	Intervalo: 10:00-14:00 h	Horário Tarde: 14:00-18:00 h
$n-1$	vermelho NR 40 cm branco R	sacarose 20 % + vitamina	sacarose 20 % + vitamina
n	vermelho NR 40 cm branco R	sacarose 20 % + vitamina	vermelho R 40 cm branco NR

Tabela 11. Teste de Avaliação 01b - Horário da Tarde, mostrando a supressão da oferta dos dois bebedouros do horário da manhã e os bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) do horário da tarde.

Horário Manhã: 06:00-10:00 h	Intervalo: 10:00-14:00 h	Horário Tarde: 14:00-18:00 h
<p>sacarose 20 % + vitamina</p>	<p>sacarose 20 % + vitamina</p>	<p>vermelho R</p> <p>branco NR</p>

O segundo teste avaliou o tipo de pista que os animais estariam utilizando na distinção dentre os dois bebedouros; localização espacial, i.e., suas posições relativas (direita e esquerda), ou pistas intrínsecas, i.e., suas cores distintas (vermelho ou branco). Este teste envolveu a supressão das pistas intrínsecas, com a apresentação de dois bebedouros idênticos da cor reforçada do horário, mantendo-se, porém, a disposição espacial do reforço (Tabela 12, Teste de Avaliação 02). Caso os animais se direcionassem preferencialmente ao local reforçado, poder-se-ia concluir que estavam se valendo da posição relativa dos bebedouros; se, ao contrário, não mostrassem distinção de visitas entre os bebedouros, concluir-se-ia que estavam se valendo da cor na distinção dos bebedouros.

Tabela 12. Teste de Avaliação 02, mostrando o oferecimento de dois bebedouros idênticos das cores reforçadas dos horários, porém mantendo-se os locais reforçados (R) e não reforçados (NR) previamente estabelecidos.

Horário Manhã: 06:00-10:00 h	Intervalo: 10:00-14:00 h	Horário Tarde: 14:00-18:00 h
<p>branco NR</p> <p>branco R</p>	<p>sacarose 20 % + vitamina</p>	<p>vermelho R</p> <p>vermelho NR</p>

O terceiro Teste de Avaliação, como complemento ao Teste 02, avaliou também o tipo de pista que os animais estariam utilizando, porém, envolveu a troca do local da disponibilidade do reforço, mas mantendo-se associado à pista intrínseca do horário (Tabela 13, Teste de Avaliação 03). Na hipótese dos animais se direcionarem preferencialmente à cor reforçada, pode-se concluir que estariam se valendo da pista cor; se, ao contrário, se direcionassem ao bebedouro oposto, concluir-se-ia que estariam se valendo da localização espacial na distinção dos bebedouros.

Tabela 13. Teste de Avaliação 03, mostrando a troca do local do bebedouro reforçado (R) e não reforçado (NR), porém mantendo-os associados às pistas intrínsecas do horário.

Horário Manhã: 06:00-10:00 h	Intervalo: 10:00-14:00 h	Horário Tarde: 14:00-18:00 h
<p>branco R</p> <p>40 cm</p> <p>vermelho NR</p>	<p>sacarose 20 % + vitamina</p>	<p>branco NR</p> <p>40 cm</p> <p>vermelho R</p>

b) Experimento 08 - Memória Espaço-Temporal: Distância de 40 centímetros Entre os Bebedouros

Este experimento envolveu a manipulação de dois bebedouros experimentais vermelhos idênticos, distantes 40 cm horizontalmente, ao longo de 38 dias de experimento (do dia 24 de abril ao dia 31 de maio de 2006), sendo que no horário da manhã, o reforço era oferecido no bebedouro da direita e no horário da tarde era oferecido no bebedouro da esquerda. A Tabela 14 mostra o desenho experimental.

Tabela 14. Experimento 08 - Desenho experimental mostrando o intervalo com o bebedouro comercial e os horários manhã e tarde com os dois bebedouros vermelhos; no horário da manhã, o da direita reforçado (R) e o da esquerda não reforçado (NR) e, no horário da tarde, o da direita não reforçado e o da esquerda reforçado.

Horário Manhã: 06:00-10:00 h	Intervalo: 10:00-14:00 h	Horário Tarde: 14:00-18:00 h
<p>sacarose 20 % + vitamina</p>

De maneira semelhante ao experimento anterior, o primeiro Teste de Avaliação revelou a estratégia adotada pelos animais na aprendizagem da tarefa e envolveu a supressão da apresentação dos dois bebedouros em apenas um dos horários do dia, com a oferta do bebedouro comercial apenas, mantendo-se a relação temporal previamente estabelecida (Tabelas 15 e 16, Teste de Avaliação 01a e 01b). Similarmente, na hipótese dos animais direcionarem as suas visitas ao bebedouro reforçado do horário, pode-se concluir que houve uma aprendizagem da relação local do reforço alimentar e horário do dia; se, ao contrário, direcionassem as suas visitas ao bebedouro não reforçado do horário, concluir-se-ia que adotaram uma estratégia não temporal na resolução da tarefa, como a aprendizagem de uma seqüência de oferecimento do reforço. Novamente, cada horário, manhã e tarde, foi suprimido por duas vezes, totalizando quatro horários analisados.

Tabela 15. Teste de Avaliação 01a - Horário da Manhã (dia n), mostrando a supressão da oferta dos dois bebedouros do horário da tarde do dia anterior ($n-1$) e os bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) por horário.

Dia	Horário Manhã: 06:00-10:00 h	Intervalo: 10:00-14:00 h	Horário Tarde: 14:00-18:00 h
$n-1$	vermelho NR 40 cm vermelho R	sacarose 20 % + vitamina	sacarose 20 % + vitamina
n	vermelho NR 40 cm vermelho R	sacarose 20 % + vitamina	vermelho R 40 cm vermelho NR

Tabela 16. Teste de Avaliação 01b – Horário da Tarde, mostrando a supressão da oferta dos dois bebedouros do horário da manhã e os bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) do horário da tarde.

Horário Manhã: 06:00-10:00 h	Intervalo: 10:00-14:00 h	Horário Tarde: 14:00-18:00 h
sacarose 20 % + vitamina	sacarose 20 % + vitamina	vermelho R 40 cm vermelho NR

O outro teste avaliou o tipo de pista que os animais estariam utilizando na distinção dentre os dois bebedouros; localização espacial, i.e., suas posições relativas (direita e esquerda), ou pistas intrínsecas potencialmente não controladas, como pequenas marcas identificáveis visualmente nos bebedouros ou o cheiro da solução de sacarose. Este teste envolveu a troca do local da disponibilidade do reforço em cada um dos horários (Tabela 17, Teste de Avaliação 04). Caso os animais se direcionassem preferencialmente ao local reforçado, poder-se-ia concluir que usaram de alguma pista intrínseca não controlada; se, ao contrário, se direcionassem ao outro local, que usualmente se encontrou reforçado ao longo do experimento, concluir-se-ia que usaram a posição relativa dos bebedouros no estabelecimento da relação reforço/horário do dia.

Tabela 17. Teste de Avaliação 04, mostrando a troca do local dos bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) por horário.

Horário Manhã: 06:00-10:00 h	Intervalo: 10:00-14:00 h	Horário Tarde: 14:00-18:00 h
<p>vermelho R 40 cm vermelho NR</p>	<p>sacarose 20 % + vitamina</p>	<p>vermelho NR 40 cm vermelho R</p>

c) Experimento 09 - Memória Espaço-Temporal - Distância Entre os Bebedouros de 05 metros

Este último experimento envolveu essencialmente a mesma manipulação do anterior, ao oferecer dois bebedouros experimentais amarelos idênticos, porém distantes 05 metros cada um, por 40 dias consecutivos (do dia 12 de março ao dia 20 de abril de 2007), sendo que no horário da manhã o reforço era oferecido no bebedouro da esquerda, e no horário da tarde o reforço era oferecido no bebedouro da direita. A Tabela 18 mostra o desenho experimental.

Tabela 18. Experimento 09 - Desenho experimental mostrando o intervalo com o bebedouro comercial e os horários manhã e tarde com os dois bebedouros amarelos; no horário da manhã, o da esquerda reforçado (R) e o da direita não reforçado (NR) e, no horário da tarde, o da esquerda não reforçado e o da direito reforçado.

Horário Manhã: 06:00-10:00 h	Intervalo: 10:00-14:00 h	Horário Tarde: 14:00-18:00 h
amarelo R amarelo NR	sacarose 20 % + vitamina	amarelo NR amarelo R

De maneira semelhante aos experimentos anteriores, o primeiro Teste de Avaliação revelou a estratégia adotada pelos animais na aprendizagem da tarefa; ele envolveu a supressão da apresentação dos dois bebedouros em apenas um dos horários do dia, com a oferta de apenas o bebedouro comercial, mantendo-se a relação temporal previamente estabelecida (Tabelas 19 e 20, Teste de Avaliação 01a e 01b). Similarmente, na hipótese dos animais direcionarem as suas visitas ao bebedouro reforçado do horário, poder-se-ia concluir que houve uma aprendizagem da relação local do reforço alimentar e horário do dia; se, ao contrário, direcionassem as suas visitas ao bebedouro não reforçado do horário, concluir-se-ia que adotaram uma estratégia não temporal na resolução da tarefa, como a aprendizagem de uma sequência de oferecimento do reforço.

Tabela 19. Teste de Avaliação 01a - Horário da Manhã (dia n), mostrando a supressão da oferta dos dois bebedouros do horário da tarde do dia anterior ($n-1$) e os bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) por horário.

Dia	Horário Manhã: 06:00-10:00 h	Intervalo: 10:00-14:00 h	Horário Tarde: 14:00-18:00 h
$n-1$	amarelo R amarelo NR	sacarose 20 % + vitamina	sacarose 20 % + vitamina
n	amarelo R amarelo NR	sacarose 20 % + vitamina	amarelo NR amarelo R

Tabela 20. Teste de Avaliação 01b – Horário da Tarde, mostrando a supressão da oferta dos dois bebedouros do horário da manhã e os bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) do horário da tarde.

Horário Manhã: 06:00-10:00 h	Intervalo: 10:00-14:00 h	Horário Tarde: 14:00-18:00 h
sacarose 20 % + vitamina	sacarose 20 % + vitamina	amarelo NR amarelo R

Similarmente ao experimento anterior, o segundo Teste avaliou o tipo de pista que os animais estariam utilizando na distinção dos dois bebedouros; localização espacial, i.e., suas posições relativas (direita e esquerda), ou pistas intrínsecas eventualmente não controladas. Este teste envolveu a troca do local da disponibilidade do reforço em cada um dos horários (Tabela 21, Teste de Avaliação 04). Caso os animais se direcionassem preferencialmente ao local reforçado, poder-se-ia concluir que usaram alguma pista intrínseca não controlada; se, ao contrário, se direcionassem ao outro local, que usualmente foi reforçado ao longo do experimento, concluir-se-ia que usaram a localização espacial dos bebedouros no estabelecimento da relação reforço/horário do dia.

Tabela 21. Teste de avaliação 04, mostrando a troca do local dos bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) por horário.

Horário Manhã: 06:00-10:00 h	Intervalo: 10:00-14:00 h	Horário Tarde: 14:00-18:00 h
amarelo NR amarelo R	sacarose 20 % + vitamina	amarelo R amarelo NR

4.3. Resultados

A Tabela 22 e a Figura 15 resumem os dados das visitas realizadas por horário por dia aos bebedouros reforçados e não reforçados pelos indivíduos do Experimento 07, que envolveu o oferecimento de dois bebedouros de cores distintas, separados em 40 cm; do Experimento 08, que envolveu dois bebedouros de mesma cor, separados em 40 cm; e do Experimento 09, que envolveu dois bebedouros de mesma cor, porém separados em 05 m. Todos os beija-flores dos três experimentos realizaram um número significativamente maior de visitas por horário por dia aos bebedouros reforçados em relação aos não reforçados (Teste de Friedman, $p < 0,001$). Pela Figura 15, fica claro que há variação no número de visitas que os diferentes animais realizam aos bebedouros; de fato, observam-se diferenças significativas no número de visitas totais realizadas por horário por dia entre os indivíduos (Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,001$), mostrando que alguns indivíduos realizam mais visitas aos bebedouros que outros. Ainda, ao se comparar o número de visitas entre os indivíduos do mesmo experimento, observa-se que há sempre um indivíduo que “domina” os bebedouros, realizando mais visitas por dia que os demais (Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,001$), o que seria um claro indicativo do comportamento territorial desses animais.

Tabela 22. Medianas e intervalos interquartis (quartil 25 e quartil 75) do número total de visitas realizadas aos bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) por horário, manhã e tarde, por dia, e os p-valores (asteriscos indicam diferenças significativas) do Teste de Friedman das comparações entre os escores relativos aos bebedouros reforçados e não reforçados pelos beija-flores E₁₃, E₁₄, E₁₅, E₁₆, E₁₇, E₁₈, E₁₉, E₂₀, E₂₁ e E₂₂.

			visitas R/horário/dia			visitas NR/horário/dia			signif.
			Q25	mediana	Q75	Q25	mediana	Q75	p
Exp. 07 cores distintas 40cm	BF E ₁₃	manhã	20,00	24,00	30,50	2,00	3,00	4,00	< 0,001 *
		tarde	15,00	22,00	27,50	1,00	2,00	3,00	< 0,001 *
	BF E ₁₄	manhã	2,00	4,00	6,50	1,00	1,00	2,00	< 0,001 *
		tarde	3,00	6,00	9,00	1,00	1,00	2,50	< 0,001 *
	BF E ₁₅	manhã	2,50	4,00	7,50	0,00	1,00	1,00	< 0,001 *
		tarde	1,00	4,00	5,00	0,00	1,00	2,00	< 0,001 *
Exp. 08 bebed. iguais 40cm	BF E ₁₆	manhã	2,00	3,00	5,50	1,00	1,00	2,00	< 0,001 *
		tarde	1,00	4,00	5,00	0,00	1,00	2,00	< 0,001 *
	BF E ₁₇	manhã	21,75	26,50	32,00	2,00	3,00	6,00	< 0,001 *
		tarde	18,75	24,50	30,00	1,00	2,00	5,00	< 0,001 *
	BF E ₁₈	manhã	5,75	11,50	14,25	1,00	1,50	4,00	< 0,001 *
		tarde	5,00	9,00	11,00	0,00	1,00	3,00	< 0,001 *
Exp. 09 bebed. iguais 05m	BF E ₁₉	manhã	4,00	7,00	13,25	1,00	2,50	4,25	< 0,001 *
		tarde	3,00	5,50	15,75	0,00	1,00	3,00	< 0,001 *
	BF E ₂₀	manhã	12,25	22,00	26,00	1,00	2,00	3,00	< 0,001 *
		tarde	7,50	18,00	21,00	1,00	1,50	2,75	< 0,001 *
	BF E ₂₁	manhã	12,25	18,00	27,50	0,25	1,00	2,00	< 0,001 *
		tarde	6,00	9,50	19,00	0,00	1,00	1,00	< 0,001 *
	BF E ₂₂	manhã	4,25	7,50	10,75	1,00	1,00	2,00	< 0,001 *
		tarde	4,00	7,00	12,00	0,00	1,00	1,75	< 0,001 *

Figura 15. “Box-plot” do número de visitas realizadas por horário por dia aos bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) pelos beija-flores A) do Experimento 07 (E₁₃, E₁₄, E₁₅ e E₁₆), B) do Experimento 08 (E₁₇, E₁₈, E₁₉), e C) do Experimento 09 (E₂₀, E₂₁ e E₂₂). Os limites inferior e superior do retângulo indicam, respectivamente, o quartil 25 e 75, a linha horizontal dentro do retângulo indica a mediana, as barras que partem do retângulo expressam as medidas máximas e mínimas e os asteriscos acima destas barras indicam os *outliers* da distribuição. Comparando os escores relativos aos diferentes bebedouros por indivíduo, os asteriscos simples (*) indicam as diferenças significativas do Teste de Friedman ($p < 0,001$).

A análise da frequência relativa de visitas ao bebedouro reforçado por horário por dia (número de visitas ao bebedouro reforçado/total de visitas por horário por dia) e ao bebedouro não reforçado (=1- frequência relativa de visitas ao bebedouro reforçado), por grupo de beija-flores, ao longo dos dias dos experimentos (Figura 16), mostra uma queda significativa nas medianas das frequências relativas de visitas ao bebedouro não reforçado e aumento nas medianas das frequências ao bebedouro reforçado, por horário manhã e tarde, ao longo dos dias, para todos os experimentos (Teste de Friedman, $p < 0,05$), indicando a aquisição da tarefa pelos animais.

Figura 16. Legenda na próxima duas páginas.

Figura 16. Legenda na próxima página.

Figura 16. Mediana das freqüências relativas de visitas aos bebedouros reforçados (R) e não reforçados (NR) (número de visitas aos bebedouros reforçados ou não reforçados/número total de visitas por horário por dia), por dia de experimento, divididas nos horários da manhã e da tarde, respectivamente, pelos beija-flores do Experimento 07 – animais E₁₃, E₁₄, E₁₅ e E₁₆ (A e B); do Experimento 08 - animais E₁₇, E₁₈ e E₁₉ (C e D); e do Experimento 09 – animais E₂₀, E₂₁ e E₂₂. (E e F). As linhas contínuas representam as regressões lineares das medianas das freqüências relativas de visitas aos bebedouros reforçados e as linhas pontilhadas as regressões lineares das medianas das freqüências relativas de visitas aos bebedouros não reforçados e suas respectivas equações das retas; os asteriscos representam a significâncias das regressões lineares ($p < 0,05$).

Ainda, ao se comparar as freqüências relativas de visitas aos bebedouros não reforçados entre os indivíduos, observam-se diferenças significativas (Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,001$), o que pode estar indicando diferenças de desempenho entre os animais. De fato, ao se comparar apenas as medianas das freqüências relativas de visitas aos bebedouros não reforçados agrupadas por indivíduos do mesmo experimento, observam-se diferenças significativas (Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) indicando que os beija-flores do Experimento 09 realizaram relativamente uma maior freqüência relativa de visitas aos bebedouros reforçados que os beija-flores do Experimento 08, que, por sua vez, realizaram relativamente uma maior freqüência relativa de visitas aos bebedouros reforçados que os beija-flores do Experimento 07. Estes resultados podem estar indicando que as diferentes manipulações experimentais resultaram em desempenhos distintos. Porém, se levarmos em conta que, conforme mostrado anteriormente, todos os experimentos apresentaram um indivíduo que “domina” os bebedouros e realiza o maior número de visitas e outros indivíduos que realizam menos visitas, estas diferenças encontradas no desempenho podem ser resultado secundário do

comportamento territorial desses animais. Uma vez que, mesmo se comparado relativamente os escores das visitas (visitas aos bebedouros reforçados ou não reforçados/visitas totais), os indivíduos que realizam menos visitas acabam apresentando relativamente mais erros (visitas aos bebedouros não reforçados) que os indivíduos que dominam, uma vez que a maior proporção de visitas aos bebedouros não reforçados se dá no início das visitas do horário e, portanto, indivíduos que dominam os bebedouros realizam relativamente menos erros que os demais. Para testar essa hipótese, comparou-se apenas os escores relativos das visitas aos bebedouros não reforçados entre os indivíduos “dominantes” dos diferentes experimentos (isto é, os animais E₁₃, E₁₇ e E₂₀), não sendo agora encontradas diferenças significativas entre esses indivíduos (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,425$), indicando que não houve diferenças de desempenho, ao menos por partes destes animais, entre as diferentes manipulações experimentais.

A fim de avaliar se os beija-flores associaram a disponibilidade diferencial de alimento por horário, ao longo dos dias de teste, sob as diferentes condições experimentais, analisou-se apenas as primeiras visitas dos indivíduos por horário. As Tabelas 23, 24 e 25 mostram as primeiras visitas do horário, se ao bebedouro reforçado ou não-reforçado, por dia de experimento, para todos os indivíduos dos três experimentos e as Figuras 17, 18 e 19 mostram a soma das primeiras visitas dos horários manhã e tarde pelos indivíduos, se ao bebedouro reforçado ou não-reforçado, por dia de experimento. Observa-se, para os três experimentos, um aumento significativo das primeiras visitas ao bebedouro reforçado e conseqüente queda ao bebedouro não reforçado, ao longo dos dias (ANOVA, $p < 0,01$), indicando a aquisição da tarefa. Ainda, não foi observada diferença significativa entre os escores dos indivíduos dos três experimentos (ANOVA, $p = 0,157$), indicando uma taxa de aprendizagem semelhante.

Figure 1 displays four heatmaps showing the distribution of 41 different types of errors (E13, E14, E15, E16) across 41 error types (R, NR). The heatmaps are arranged in a 2x2 grid. Each heatmap has a grid of 41x41 cells. The columns are labeled 1 to 41, and the rows are labeled R and NR. The heatmaps show the frequency of each error type for each error type. A legend indicates that black cells represent 'R' (Right) and white cells represent 'NR' (Not Right).

Tabela 24. Primeiras visitas do horário da manhã (M) e da tarde (T) por dia de teste, se ao bebedouro reforçado (R, em preto) ou ao não reforçado (NR, em branco), pelos beija-flores E₁₇, E₁₈ e E₁₉ do Experimento 08.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Total	
E ₁₇	M																																							R	NR
	T																																							26	12
																																							32	6	

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Total		
E ₁₈	M																																								R	NR
	T																																								28	10
																																							30	8		

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Total		
E ₁₉	M																																								R	NR
	T																																								22	16
																																							32	6		

Legenda

R

NR

Figura 18. Soma das primeiras visitas, se ao bebedouro reforçado (R) ou não reforçado (NR), realizadas nos horários da manhã e da tarde, por dia de experimento, dos beija-flores E₁₇, E₁₈, e E₁₉ do Experimento 08. As linhas contínuas representam as regressões lineares das visitas ao bebedouro reforçado e as linhas pontilhadas representam as regressões lineares das visitas ao bebedouro não reforçado, com suas respectivas Equações da Reta; os asteriscos representam as significâncias das regressões lineares ($p < 0,05$).

Tabela 25. Primeiras visitas do horário da manhã (M) e da tarde (T) por dia de teste, se ao bebedouro reforçado (R, em preto) ou ao não reforçado (NR, em branco), pelos beija-flores E₂₀, E₂₁ e E₂₂ do Experimento 09.

																																								Total			
E ₂₀	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	R	NR
	T																																										34
																																								27	13		

																																								Total				
E ₂₁	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	R	NR	
	T																																											34
																																								31	9			

																																								Total				
E ₂₂	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	R	NR	
	T																																											32
																																								31	9			

R

NR

Legenda

Figura 19. Soma das primeiras visitas, se ao bebedouro reforçado (R) ou não reforçado (NR), realizadas nos horários da manhã e da tarde, por dia de experimento, dos beija-flores E₂₀, E₂₁, e E₂₂ do Experimento 09. As linhas contínuas representam as regressões lineares das visitas ao bebedouro reforçado e as linhas pontilhadas representam as regressões lineares das visitas ao bebedouro não reforçado, com suas respectivas equações da reta; os asteriscos representam as significâncias das regressões lineares ($p < 0,05$).

Os Testes de Avaliação, realizados após os períodos de treinamento, foram desenvolvidos a fim de avaliar a natureza da aprendizagem dos animais. Levou-se em conta apenas as primeiras visitas dos horários, manhã ou tarde, em que os indivíduos visitaram o local. Os Testes de Avaliação 01, aplicados nos três experimentos, avaliou o tipo de estratégia (temporal ou não temporal) adotada pelos animais na aprendizagem da tarefa (ver Tabelas 10, 11, 15, 16, 19 e 20 em Materiais e Métodos, para o desenho experimental). A Figura 20 mostra o número de indivíduos que realizou as primeiras visitas do horário, da manhã (Figura 20A) ou da tarde (Figura 20B), subsequente à supressão do horário anterior, ao bebedouro reforçado ou ao não reforçado, por experimento. Observa-se que a maioria dos indivíduos dirigiu a sua primeira visita do horário ao bebedouro reforçado, em ambos os horários (Teste de Mann-Whitney, $p < 0,01$), indicando a adoção de uma estratégia temporal na resolução da tarefa, em detrimento à adoção de uma regra de sequência de eventos, ou seja, a maioria dos animais parece ter associado à disponibilidade de alimento ao horário do dia.

Figura 20. Testes de Avaliação 01- Estratégia Temporal x Não Temporal: número de indivíduos que realizou as primeiras visitas do horário A) da manhã e B) da tarde, subsequente à supressão dos bebedouros do horário anterior, ao bebedouro reforçado (R) ou ao não reforçado (NR), por Experimento 07, 08 e 09. Dias 1 e 2 referem-se aos dias em que os testes foram replicados para cada experimento. O asterisco simples (*) indica diferenças significativas entre os escores dos bebedouros reforçados e não reforçados (Teste de Mann-Whitney, $p < 0,01$).

O Teste de Avaliação 02, realizado apenas no Experimento 07, que investigou o tipo de pista (cor ou local dos bebedouros) que estaria sendo utilizado na distinção dentre os dois bebedouros, envolveu a supressão da pista cor ao oferecer dois bebedouros idênticos, mas mantendo-se a relação espaço-temporal previamente estabelecida (ver Tabela 12, em Materiais e Métodos, para o desenho experimental). Isto é, na fase de treino os animais tiveram acesso a dois bebedouros de cores distintas sempre associados à mesma localização espacial e, portanto, estes poderiam estar se guiando tanto pela cor distinta quanto pela posição relativa dos bebedouros. Neste Teste de Avaliação ofereceu-se dois bebedouros da mesma cor, mas, mantendo reforçado o local do horário. Observa-se pela Figura 21, que apresenta o número de indivíduos que realizou a primeira visita do horário, da manhã ou da tarde, ao bebedouro reforçado ou ao não reforçado, que os animais não tenderam a visitar qualquer dos locais preferencialmente (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,353$), indicando que a pista cor estava provavelmente sendo privilegiada na distinção entre os dois bebedouros durante o período de treinamento.

Figura 21. Teste de Avaliação 02 – Experimento 07 – Cor x Local dos Bebedouros: número de indivíduos que realizou a primeira visita do horário, manhã e tarde, ao bebedouro reforçado (R) ou não reforçado (NR), com o oferecimento de bebedouros idênticos e a prevalência da relação horário-espaco do reforço. Dias 1 e 2 referem-se aos dias em que os testes foram replicados. Não foi encontrada diferença significativa entre os escores relativos aos bebedouros (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,353$).

O Teste de Avaliação 03, realizado também apenas no Experimento 07, como complemento ao Teste 02, avaliou o tipo de pista que os animais estariam utilizando; porém, envolveu a troca do local da disponibilidade do reforço, mas mantendo-o associado à pista intrínseca do horário (ver Tabela 13, em Materiais e Métodos, para o desenho experimental). Isto é, conforme detalhado anteriormente, na fase de treino os animais tiveram acesso a dois bebedouros de cores distintas associados à mesma localização espacial e, portanto, estes poderiam estar se guiando tanto pela cor distinta quanto pela posição relativa dos bebedouros. Neste Teste de Avaliação manteve-se o reforço associado à cor reforçada do horário, porém com a troca da sua posição relativa. Observa-se, pela Figura 22, que apresenta o número de indivíduos que realizou a primeira visita do horário, da manhã ou da tarde, ao bebedouro reforçado ou ao não reforçado, que a maioria dos animais dirigiu a sua primeira visita ao bebedouro reforçado (Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$), isto é, à cor reforçada do horário, corroborando com os resultados do Teste de Avaliação 02 de que estes estavam se utilizando da cor distinta dos bebedouros, independente das suas posições relativa, para se dirigir ao bebedouro reforçado do horário durante a fase de treino.

Figura 22. Teste de Avaliação 03 – Experimento 07 – Cor ou Local dos Bebedouros: número de indivíduos que realizou a primeira visita do horário, manhã e tarde, ao bebedouro reforçado (R) ou não reforçado (NR), com a manutenção do reforço associado à pista intrínseca do horário, porém, mudando-se o local de oferecimento. Dias 1 e 2 referem-se aos dias em que os testes foram replicados para cada experimento. O asterisco simples (*) indica diferenças significativas entre os escores dos bebedouros reforçados e não reforçados (Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Os Testes de Avaliação 04, aplicados nos Experimentos 08 e 09, avaliaram o tipo de pista que os animais utilizaram na distinção dentre os bebedouros e envolveram a troca do local de oferecimento do reforço por horário (ver Tabelas 17 e 21, em Materiais e Métodos, para o desenho experimental). Uma vez que, em ambos os experimentos, foram oferecidos dois bebedouros de mesma cor, com o reforço associado a um dos locais em cada horário manhã e tarde, ao realizar a troca do local relativo do reforço, é possível avaliar se os animais estariam associando o reforço ao local distinto em cada horário ou se estariam se guiando por pistas não controladas, como o cheiro da solução de sacarose. Os resultados (Figura 23) mostraram que a maioria dos indivíduos dirigiu a primeira visita do horário ao local não reforçado (Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$), isto é, se dirigiram ao local que usualmente se encontrou reforçado durante a fase de treino, indicando que os beija-flores estavam se guiando pela localização espacial dos bebedouros no estabelecimento da relação reforço-horário, em detrimento ao uso de pistas olfativas ou visuais não controladas dos bebedouros.

Figura 23. Testes de Avaliação 04 – Experimentos 08 e 09 – Local ou Pistas Não Controladas: número de indivíduos que realizou a primeira visita do horário, manhã e tarde, ao bebedouro reforçado (R) ou não reforçado (NR), com a troca do local de oferecimento do reforço por horário, manhã e tarde. Os asteriscos duplos (**) indicam diferenças significativas entre os escores dos bebedouros reforçados e não reforçados (Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

4.4. Discussão

Os resultados do presente conjunto de experimentos mostraram que os beija-flores da espécie *E. macroura* são capazes de aprender, nas diferentes situações experimentais, a associação entre horário do dia (“quando”) e reforço alimentar (“o quê”), diminuindo sua frequência relativa de erros por horário (visitas aos bebedouros não reforçados/visitas totais do horário por dia) (Figura 16) e aumentando significativamente as suas primeiras visitas ao bebedouro reforçado do horário ao longo dos dias de experimento (Figuras 17, 18 e 19). Os resultados dos testes de avaliação, que envolveram a troca do local ou da cor do bebedouro reforçado relativos a cada horário, mostraram que os animais podem fazer uso tanto das pistas de cor (“o quê”) para diferenciar o bebedouro reforçado do horário (“quando”) (Testes de Avaliação 02 e 03 – Figuras 21 e 22) quanto, na presença de bebedouros de cor idêntica, aprender a associação horário-disposição espacial (“quando-onde”) do reforço (Teste de Avaliação 04 – Figura 23).

Os animais podem adotar diferentes estratégias para lidar com as demandas espaciais e temporais de seu ambiente. Manipulações experimentais, como as realizadas no presente conjunto de experimentos, permitem revelar o tipo de estratégia adotada na resolução das tarefas. Admite-se que dentre as estratégias usualmente adotadas pelos animais incluem-se:

1. Estratégias de medição temporal propriamente ditas. Isto é, quando o animal mede de fato a passagem de tempo. Isto pode ser feito de duas maneiras: **1.a. Medição circadiana.** Na temporização do tipo circadiana o organismo consulta constantemente seu relógio circadiano de tal forma que numa situação de aprendizagem a variável “hora do dia” é um estímulo a ser aprendido e associado. Esta temporização baseia-se na fase de um oscilador endógeno, contínuo, auto-sustentável e sincronizável. Como é auto-sustentável não requer a presença de pistas externas para organizar temporalmente o comportamento (i.e., aprendizagem de uma associação espaço-temporal). Neste tipo de sistema, o papel de pistas temporais externas é de atuar como um sincronizador. Em outras palavras, se o sistema circadiano está participando deste tipo de aprendizagem, o ritmo aprendido persistirá na ausência de sincronizadores externos. **1.b. Medição por intervalos.** A temporização por medição de intervalos também requer um mensurador de tempo, mas para mensuração de intervalos.

WRIGHT (2002) propôs que essa função é desempenhada por um conjunto de estruturas nervosas denominadas gânglios da base. Este mensurador de tempo teria características de um cronômetro que pode ser iniciado, parado e reiniciado por diversos eventos externos; assim, alterações dos estímulos externos afetariam imediatamente qualquer tipo de comportamento associado com este tipo de relógio. Por exemplo, o relógio de intervalo é reiniciado a cada dia pelo início da sessão matutina. Isto assegura que o animal começará a organizar temporalmente seus comportamentos todos os dias a partir desta sessão. Quando a hora do início da sessão é alterada ou mesmo suprimida, o relógio de intervalo imediatamente se adequa de modo que o animal reorganizará sua sequência de eventos diários segundo o novo ponto de partida. Ou seja, se numa tarefa espaço-temporal, o animal estiver utilizando o relógio de intervalo, sua rotina diária aprendida será reiniciada.

2. Estratégias não-temporais. São aquelas nas quais o animal não mede o transcurso do tempo. **2.a. Alternância.** O animal aprende que deve alternar de um recurso a outro em cada sessão. Para avaliar esta possibilidade é necessário omitir aleatoriamente sessões e analisar o desempenho na sessão seguinte a uma sessão omitida. Se os animais estiverem utilizando uma estratégia de alternância, a omissão de uma sessão determinará o direcionamento ao local incorreto na sessão seguinte. Este tipo de estratégia é efetivo no caso de duas sessões diárias. Se o número de sessões é aumentado para três ou mais, cada uma utilizando uma localização diferente, uma regra de alternância para aquisição do comportamento é desestimulada. **2.b. Aprendizagem da sequência de eventos diários.** Os animais aprendem qual é a sequência de eventos que acontece a cada dia. Por exemplo, obter comida no local A, depois obter comida no local B e depois obter comida no local C. Embora este tipo de estratégia tenha um componente não-temporal, pode-se também considerar a existência de um componente temporal já que o indicador da sequência é reiniciado no início de cada dia. **2.c. Pistas contextuais.** Os animais poderiam aprender a escolher um ou outro comedouro na presença de um conjunto específico de pistas contextuais tanto externas como internas. Ou seja, além de todas as pistas externas que caracterizam a situação de aprendizagem, incluindo temperatura, luminosidade, ângulo do sol, ventos, sons, entre outros, pistas internas sobre o estado do animal naquele momento poderiam ser também associadas. Estas poderiam incluir variáveis tais como a intensidade da fome, estado de alerta, nível de cansaço, entre outros. (VALENTINUZZI, 2002).

Parece claro que os beija-flores da espécie *E. macroura* aqui estudados se basearam numa estratégia de medição temporal do tipo circadiana pelo fato dos animais manterem a associação horário-reforço alimentar mesmo com a supressão dos bebedouros do horário anterior e de não conseguirem encontrar o alimento com a troca da cor ou do local de oferecimento do reforço, descartando o uso de estratégias temporais do tipo medição de intervalo e estratégias não temporais como de alternância ou de aprendizagem de uma sequência de eventos ou até mesmo o uso de pistas contextuais olfativas ou visuais eventualmente não controladas.

De fato, conforme citado na introdução, este tipo de aprendizagem espaço-temporal, baseada num temporizador endógeno, vem sendo demonstrado em diferentes grupos de insetos sociais, peixes e aves.

O primeiro relato sistemático deste fenômeno foi realizado em 1910 pelo médico suíço August Forel. Numa manhã, quando Forel e sua família tomavam café da manhã no quintal da sua casa de campo nos Alpes Suíços, observaram que um grupo de abelhas apareceu para experimentar restos de geléia na mesa. Após alguns dias, Forel observou que as abelhas apareciam todos os dias um pouco antes da hora do café da manhã, como se antecipassem a hora certa (*apud* MOORE-EDE *et al.*, 1982). Estas observações foram replicadas em experimentos controlados de laboratório, mostrando que abelhas que recebem solução açucarada todos os dias no mesmo horário, numa localização específica, aparecem no local todos os dias com uma precisão temporal surpreendente, inclusive com uma pequena antecendência e, em dias específicos de teste, quando a solução não era fornecida, as abelhas continuam a aparecer no mesmo horário e local. Resultados similares são obtidos quando a colméia é mantida em condições de iluminação constantes; ou seja, a capacidade de aprendizagem espaço-temporal das abelhas é mantida, sugerindo a existência de um temporizador endógeno e independente de pistas externas. Outra evidência do caráter endógeno desse processo advém do fato das abelhas só conseguirem esse desempenho quando a disponibilidade de alimento ocorre em ciclos de aproximadamente 24 horas (entre 20 e 26 horas). Se o período de disponibilidade alimentar é, por exemplo, 19 ou 28 horas, as abelhas são incapazes de utilizar este padrão temporal em associação com a memória espacial, pois estariam fora da faixa de sincronização circadiana (MOORE, 2001). O experimento que confirmou que as abelhas de fato não estavam se baseando em pistas ambientais não-controladas foi realizado por Renner, em 1955 (*apud* MOORE-EDE *et al.*, 1982). Em seu laboratório, na França, ele treinou 40 abelhas a procurarem alimento entre 20:00 e

22:00h, numa determinada localização de uma sala fechada. Depois transportou a colméia durante a noite até Nova York e a colocou numa sala com uma disposição similar àquela onde o treino inicial foi realizado. No dia seguinte, em Nova York, as abelhas se direcionaram ao local correto, entre 20:00 e 22:00h, mas no fuso horário da França.

Estudos em formigas, embora ainda escassos, têm mostrado que animais da espécie *Myrmica sabuleti* aprendem a procurar alimento em duas horas distintas do dia em um local fixo, constituindo um tipo de aprendizagem temporal (CAMMAERTS, 2004). Observou-se, na espécie *Ectatomma ruidum*, de maneira similar aos beija-flores do presente estudo, que os animais aprendem a associar dois locais a dois horários distintos do dia utilizando uma estratégia de marcação circadiana, mostrando que a supressão de certas fases não desregula a associação espaço-temporal previamente estabelecida (SCHATZ *et al.*, 1999).

Nos peixes, apesar de DELICIO e col. (2006) não terem observado aprendizagem espaço-temporal nas tilápias (*Nile tilapia*), atribuído provavelmente pelo desenho experimental ou à espécie em questão, REEBS (1996) mostrou não só aprendizagem espaço-temporal em uma espécie de ciprídeo (*Notemigonus crysoleucas*) como também o uso de um relógio circadiano do desempenho da tarefa, após observar que trocas de fases do fotoperíodo não corrompe a relação previamente estabelecida.

Em aves, o uso do sistema circadiano no estabelecimento das associações tempo e espaço vem sendo mostrado em pombos (WILKIE & WILLSON, 1992, 1995; SAKSIDA & WILKIE, 1994; WILKIE *et al.*, 1994), em rouxinóis (BIEBACH *et al.*, 1989, 1991, 1994; KREBS & BIEBACH, 1989), nas gaivotas (WILKIE *et al.*, 1996, 1997), nos estorninhos (WENGER *et al.*, 1991) e nos tecelões (FALK *et al.*, 1992). Similarmente ao descrito aqui com os beija-flores, essas aves aprendem a associar diferentes locais de oferecimento de recurso alimentar com diferentes horas do dia, mantendo essa associação mesmo com a supressão de certas sessões ou com a troca de fases do fotoperíodo.

Em mamíferos os resultados são conflitantes. Ratos confrontados com um desafio temporal-espacial podem adotar estratégias de mensuração de tempo que, aparentemente, não envolvem o relógio biológico. CARR e col. (1999a, 1999b) sugeriram que os ratos simplesmente aprendem a sequência de eventos que acontece a cada dia. Estes autores utilizaram o mesmo protocolo que foi utilizado com pombos por SAKSIDA & WILKIE (1994) só que ao invés de discos para bicar utilizaram alavancas

para pressionar. Os ratos aprenderam facilmente a pressionar as alavancas corretas durante as sessões matutinas e vespertinas. Os pesquisadores, então, passaram a omitir aleatoriamente uma sessão matutina ou uma sessão vespertina. Durante as sessões matutinas, após a omissão de uma vespertina, os animais se direcionavam ao lugar correto pressionando a barra ali localizada. Porém, nas sessões vespertinas, após a omissão de uma sessão matutina, os ratos incorretamente pressionavam a alavanca cujo local correspondia às sessões matutinas. Ou seja, nestas condições experimentais, era necessário que os animais recebessem o alimento nas sessões matutinas para alterarem a escolha para a alavanca relacionada às sessões vespertinas. Neste caso ficou claro, que a hora do dia não foi o fator determinante das escolhas dos animais. Aparentemente, o comportamento estabelecido durante o treino estava baseado numa estratégia de aprendizagem da seqüência de eventos diários. Em outras palavras, os ratos provavelmente aprenderam que tinham de apertar uma alavanca na primeira sessão do dia, e apertar a segunda alavanca durante a segunda sessão de cada dia. Possivelmente, o esquema de treinamento determinou essa aprendizagem.

Já PIZZO & CRYSTAL (2002) num esquema similar de reforço por pressão de alavancas, treinaram ratos em três sessões diárias associadas a três locais reforçados distintos, mas com intervalos variáveis entre as sessões; eles observaram que atrasar ou adiantar a sessão intermediária resultava numa queda do desempenho, o que seria consistente com uma estratégia de marcação de tempo. Adicionalmente, se os animais fossem mantidos em claro constante, apresentavam um desempenho intermediário, o que seria consistente com uma estratégia mista de marcação de tempo: intervalar e circadiana. Segundo os autores, poder-se-ia considerar uma estratégia estritamente de medição por intervalos caso o desempenho fosse abaixo, uma vez que a própria transição da fase clara para escura estaria atuando como uma pista para iniciar o marcador de intervalos; ao contrário, poder-se-ia considerar uma estratégia estritamente circadiana caso o desempenho fosse bem maior após a eliminação desta pista.

Diferentemente, MISTLLBERGER e col. (1996) sugeriram que os ratos são capazes de utilizar uma estratégia circadiana do mesmo modo que as aves e insetos sociais. Ao invés de uma caixa experimental com quatro alavancas, estes autores utilizaram um labirinto em T que tinha uma alavanca em cada braço. Ratos com lesão no NSQ (Núcleo Supraquiasmático, considerado o relógio circadiano mestre nos mamíferos) e intactos foram testados. Todos aprenderam corretamente a relação entre local e horário. Sessões matutinas e vespertinas eram omitidas aleatoriamente e os

animais continuavam respondendo corretamente. Quando o ciclo CE era invertido, ou se mantinha os animais em condições de iluminação constante, os animais respondiam corretamente. Com base nesses resultados os autores concluíram que era o relógio circadiano sincronizável à alimentação que estava determinando a marcação temporal necessária para o desempenho.

Assim, é possível que os ratos possam fazer uso de múltiplas estratégias para desempenhar tarefas de tipo espaço-temporal e que o uso de uma ou outra estratégia pode variar em função das condições experimentais; possivelmente, em determinadas situações, estes utilizam uma combinação de duas ou mais estratégias para lidar com as demandas ambientais (CARR *et al.*, 1999b), mas as condições em que isso ocorre devem ser melhor investigadas.

Os resultados aqui relatados envolvendo beija-flores mostraram que, além desses animais aprenderem a associar diferentes locais (“onde”) de oferecimento de recurso alimentar com diferentes horas do dia (“quando”), aprendem associações temporais (“quando”) com os estímulos visuais intrínsecos dos recursos (“o quê”), indicando flexibilidade comportamental, uma vez que, dependendo das condições confrontadas, podem adotar diferentes estratégias de forrageamento na resolução das tarefas. Ainda, esses animais, assim como as outras aves, insetos sociais e peixes, tendem a utilizar prontamente uma estratégia de medição temporal quando confrontados com tarefas espaço-temporais, ao contrário dos ratos cujas estratégias adotadas parecem variar conforme o desenho experimental adotado.

Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar tais observações: 1) os insetos sociais, peixes e aves só possuem a capacidade de utilizar a estratégia de medição temporal circadiana ou; 2) o desenho experimental aplicado nos insetos sociais, peixes e aves não incentivou o uso de outros tipos de estratégia que não circadiana; 3) os ratos possuem uma maior flexibilidade comportamental para lidar com diferentes estratégias dependendo do problema apresentado ou; 4) a estratégia de medição temporal circadiana no ratos de laboratório tendem a ser menos requisitadas ou desenvolvidas justamente por serem animais de laboratório que geralmente vivem em ambientes confinados privados de enriquecimento ambiental. Para tanto, novos experimentos poderiam ser conduzidos para o teste destas hipóteses, envolvendo manipulações que induzam o uso de diferentes estratégias, como por exemplo, a adição de um maior número de sessões por dia, poderia induzir os insetos sociais, aves e peixes a adotar uma estratégia não-temporal e, ao contrário, prover os ratos de enriquecimento

ambiental desde o seu nascimento poderia induzi-los a adotar prontamente uma estratégia temporal.

Capítulo 05. Discussão Geral

Os resultados do presente conjunto de experimentos evidenciam a capacidade de beija-flores da espécie *E. macroura* para resolver problemas relacionados à hora, local e pistas adicionais, que, em conjunto, indicam possíveis fontes alimentares. No Capítulo 02, que investigou a preferência por concentrações distintas de soluções de sacarose, mostrou-se que esses animais se lembram da localização espacial (“onde”) de bebedouros contendo soluções com diferentes concentrações de açúcar (“o quê” - solução de sacarose a 20 % ou a 40 %) ao visitarem preferencialmente os locais contendo sacarose a 40 % ao longo do dia, evidenciando não só a preferência e uma acuidade para diferenciar qualidades alimentares distintas, como também o uso de uma memória sobre “onde” encontraram “o quê”. No Capítulo 03, que investigou a memória espacial, mostrou-se que os beija-flores podem fazer uso da localização espacial (“onde”) na diferenciação de alimentadores com ou sem alimento (“o quê”), ao visitarem preferencialmente os locais com alimento ao longo do dia; ainda, na presença de pistas intrínsecas (“o quê” – as diferentes cores), adotam uma estratégia distinta, envolvendo generalizar, a partir da cor dos bebedouros, quais locais contêm alimento. Esses resultados evidenciam não somente o uso de uma memória sobre “onde” encontrar “o quê” ao longo de um dia de experimento, como também uma memória de longa duração das experiências dos dias anteriores, uma vez que a estratégia de generalização por cores só poderia ser construída a partir de experiências prévias acumuladas ao longo de vários dias de treino. Os resultados do Capítulo 04, que investigou a memória temporal e espaço-temporal nesses beija-flores, mostraram que esses animais aprendem a associar horários distintos do dia (“quando”) a diferentes locais (“onde”) ou a diferentes cores de oferecimento de alimento (“o quê”), mantendo a associação mesmo diante da supressão de determinadas sessões, evidenciando o uso de estratégias de marcação temporal associadas ao espaço ou à pista intrínseca do bebedouro, dependendo da demanda, na resolução da tarefa.

Conforme discutido anteriormente, os beija-flores são aves altamente especializadas na exploração de néctar e possuem uma das maiores taxas metabólicas dentre os endotermos. O conhecimento sobre a qualidade do néctar oferecido pelas flores de diferentes espécies (“o quê” – como por exemplo, das concentrações distintas de soluções de néctar em flores de diferentes cores) associado ao conhecimento sobre a localização espacial (“onde”) e sobre “quando” (por exemplo, a hora do dia) que o recurso está disponível, representaria uma importante capacidade adaptativa nesses animais, que possibilitaria uma exploração mais eficiente de seu ambiente.

No conjunto, parece claro que os beija-flores da espécie estudada são capazes de processar conjuntamente informações sobre “o quê”, “quando” e “onde” relacionadas aos seus recursos alimentares. Conforme discutido na introdução, a memória explícita é definida como sendo extremamente flexível, por envolver a associação de vários itens de informação que podem ser utilizados de modo inferencial em novas situações; particularmente, seu módulo episódico envolve a lembrança de “onde” e “quando” eventos específicos (“o quê”) ocorreram. Apesar de não podermos afirmar que as relações de “o quê”, “quando” e “onde” foram estabelecidas após um episódio único de aprendizagem, os resultados aqui apresentados indicam que os beija-flores associam estas informações e as utilizam flexivelmente quando confrontados em diferentes situações experimentais, exibindo, assim, as características fundamentais definidoras de uma memória do tipo-episódica.

O primeiro relato de que animais não humanos exibem memória do tipo-episódica envolveu uma espécie de ave estocadora de alimento (*Aphelocoma coerulescens*, Passeriformes, Corvidae), e foi realizado por CLAYTON & DICKINSON (1998). O experimento consistiu num pré-treinamento em que as aves aprenderam que larvas de vespas, seu alimento preferido, degradam e se tornam impalatáveis com o passar do tempo, e aprenderam a evitá-las depois de decorrido um longo período após a captura (124 horas). Então, num primeiro estágio, as aves foram treinadas a estocarem amêndoas e larvas em locais distintos de um comedouro de areia, em duas fases de captura separadas por 120 horas. Num segundo estágio, após 4 horas da segunda fase de captura, puderam reaver os alimentos estocados; dependendo da ordem em que lhes eram oferecidas as larvas, se na primeira ou segunda fase, estas podiam ou não estar estragadas quando da recuperação do alimento. Durante o teste, realizado numa única sessão, foram oferecidas larvas ou amêndoas para serem estocadas numa ordem definida para cada animal; porém, no estágio de captura, foram oferecidos comedouros idênticos àqueles em que o alimento havia sido estocado, mas sem o alimento, apenas a areia, eliminando a possibilidade de os animais utilizarem pistas visuais ou olfativas; isto é, os animais dependiam apenas de sua memória para escolher onde procurar o alimento estocado. Observou-se que estas aves procuram preferencialmente pelas larvas de vespas quando podem reavê-las pouco tempo depois de capturadas (4 horas); entretanto, evitam-nas se decorrido um longo período de tempo após sua estocagem (124 horas), procurando por amêndoas, que demoram mais a estragar. Demonstrou-se assim corvídeos *A. coerulescens* são capazes de lembrar, após um episódio único de

estocagem, o tipo de alimento estocado (“o quê”), o local de estocagem de cada alimento (“onde”) e há quanto tempo o mesmo havia sido estocado (“quando”).

Após esse relato inicial, memória do tipo-episódica em animais vem sendo demonstrada em pombos (ZENTALL *et al.*, 2001), camundongos (DERE *et al.*, 2005) e ratos (BABB & CRYSTAL, 2006), em desenhos experimentais semelhantes. Em beija-flores, HENDERSON e col. (2006) ao oferecerem bebedouros com taxas de renovação de reforço de 10 e 20 minutos, observaram que indivíduos da espécie *Selasphorus rufus* se lembram de quais e há quanto tempo visitaram os bebedouros no último surto de visitas, aprendendo a revisita-los apenas depois de passados os intervalos de tempo correspondentes às suas taxas de renovação. Demonstrando que esses animais relacionam “quando” e “onde” obtiveram alimento no último surto de visitas.

Esses resultados corroboram com as idéias de EICHENBAUM (1994) de que a memória explícita pode ser estendida a animais não humanos; além dos animais destes estudos exibirem os elementos fundamentais que caracterizam a memória do tipo-episódica, sua capacidade de aprender e utilizar esse conhecimento em novas situações, a denominada flexibilidade comportamental, vem sendo revelada em diferentes graus em vários grupos de aves.

BATESON e col. (2003) observaram, em beija-flores da espécie *S. rufus*, o uso de mecanismos de avaliação comparativa para decisões de forrageamento. Ao confrontar os animais com duas qualidades alimentares, um bebedouro com solução de sacarose a 40 % e volume de 20 μ L (opção C – referente a concentração) e outro com solução de sacarose a 20 % e volume de 40 μ L (opção V – referente a volume), os beija-flores visitam preferencialmente a opção C; mas ao adicionar uma terceira opção, denominada “distrator”, de concentração 10 % e volume 30 μ L (distrator Dv) ou de concentração 30 % e volume 10 μ L (distrator Dc), eles demonstram uma mudança na preferência relativa nas duas primeiras opções, diminuindo a preferência da opção C sobre a V, na adição do distrator Dv, mas aumentando a preferência da opção C sobre a V, na adição do distrator Dc. Isso contraria a teoria clássica de forrageamento ótimo, que prediz que os animais avaliam opções alternativas se utilizando de valores absolutos, isto é, atribui valores fixos a cada opção, independente do número ou tipos de opções disponíveis (STEPHENS & KREBS, 1986 *apud* BATESON *et al.*, 2003). Seres humanos, ao serem confrontados com opções que variam em duas dimensões, também mostram mudança na preferência relativa pelas opções quando confrontados com uma terceira opção distratora, indicando um mecanismo de comparação, no qual o valor de

uma opção é ranqueado em relação à outra opção disponível. Este tipo de resultado é usualmente atribuído à capacidade de antecipar eventos com base em experiências prévias, denominado contraste de incentivo, que se refere à exaltação da diferença evidente entre recompensas, quando elas são experienciadas sob contigüidade temporal (FLAHERTY, 1982). Isto é, a exposição a duas ou mais recompensas, apresentadas sob certa proximidade temporal, leva o animal a acentuar ou deprimir o comportamento que teria perante uma daquelas recompensas se a mesma fosse apresentada isolada, não pareada com outra(s) recompensa(s) ou pareada com recompensa(s) de igual valor de incentivo. A acentuação ou a diminuição do comportamento perante uma das recompensas seria o reflexo da relativização, produzida pelo animal, entre os valores de incentivo de cada recompensa experienciada.

Observou-se ainda, nos beija-flores *Archilochus colubris*, *S. platycercus* e *S. rufus*, a capacidade de aprender por observação (ALTSHULER & NUNN, 2001). Ao disponibilizar alimentadores com diferentes graus de dificuldade de acesso ao alimento, verificou-se que animais “ingênuos”, isto é, aqueles que ainda não haviam tido contato com os bebedouros, aprendiam mais rapidamente a obter alimento na presença de um “tutor”, isto é, aquele que já havia aprendido a lidar com o alimentador. A habilidade de aprender por observação facultava aos animais se adaptarem mais rapidamente às mudanças de seu ambiente (ALTSHULER & NUNN, 2001) e é considerada um pré-requisito à aprendizagem social humana.

Estudos com pombos têm mostrado que esses animais são capazes de memorizar mais de 725 diferentes padrões visuais (VON FERSEN & DELIUS, 1989), aprendem a categorizar objetos em “feitos por humanos” *versus* “naturais” (LUBOW, 1974), discriminam estilos de pinturas cubistas e impressionistas (WATANABE, 1995) e comunicam-se entre si utilizando símbolos visuais (EPSTEIN *et al.*, 1980; LANZA *et al.*, 1982; LUBINSK & MacCORQUODALE, 1984). Além disso, ranqueam padrões utilizando uma lógica de “inferência transitiva” (*Transitive Inference*), por exemplo, quando confrontados com pares de padrões visuais, um reforçado com alimento (+) e outro não reforçado (-), do tipo A+B-, B+C-, C+D-, D+E-, tendem a inferir que num par BD, o B seria reforçado e o D não reforçado, preferindo o padrão B em detrimento ao D (von FERSEN *et al.*, 1992).

As corujas possuem uma sofisticada capacidade de localização por som utilizada durante a caçada noturna e que se desenvolve por aprendizagem (KNUDSEN, 2002). Beija-flores, papagaios e pássaros canoros possuem a rara habilidade de aprendizagem

vocal (GAHR, 2000) que, com exceção dos humanos, cetáceos e possivelmente morcegos, não é conhecida em nenhum outro mamífero. O papagaio cinza (*Psittacus erithacus*), em particular, é capaz de utilizar palavras humanas relacionando-as a objetos (PEPPERBERG & SHIVE, 2001) e a conceitos numéricos, inclusive para o conceito “zero” (PEPPERBERG & GORDON, 2005). Por exemplo, ao dispor diferentes quantidades de diferentes objetos de cores distintas, e perguntando-se ao animal: “*What color X?*”, numa pergunta simplificada que significaria “Qual a cor que aparece X vezes?”, o animal responde a cor correta em 80 % das tentativas, inclusive respondendo “nenhuma” (*none*) quando não há a quantidade perguntada de objetos da cor requisitada.

Pássaros das famílias Corvidae, Sittidae e Paridae são muito utilizados em experimentos de aprendizagem e memória devido a sua natureza de estocar inúmeros itens alimentares para posterior recuperação (HEALY, 1996). Considerando que, em situação natural, os pássaros estocadores freqüentemente experienciam “roubos” por outros indivíduos de seus alimentos estocados, estudo com o corvo *Corvus corax* mostrou que animais em situações de estocagem de alimento, ao serem observados por outros indivíduos, tendem a, numa fase posterior de coleta de alimento, reaver uma maior quantidade de alimento quando na presença dos indivíduos que os haviam observados do que quando na presença de indivíduos que não os haviam observado na fase de coleta do alimento, indicando uma capacidade destes animais em distinguir um indivíduo do outro e modificar seu comportamento em função de experiências passadas (BUGNYAR & HEINRICH, 2005). Similarmente, demonstrou-se em *A. coerulescens*, que indivíduos que já haviam tido a oportunidade de “roubar” de estoques de outros indivíduos, mudam de local seus alimentos previamente estocados quando observados por outros indivíduos; sugere-se que esses animais relacionam a informação sobre suas experiências prévias como um “ladrão” com a possibilidade futura de ser roubado por outro pássaro, modificando sua estratégia de estocagem de acordo (EMERY & CLAYTON, 2001).

Estudos com os corvídeos, em especial, têm mostrado o uso da lógica para resolução de certos problemas, como puxar um cordão ou utilizar ferramentas para alcançar alimentos (HEINRICH & BUGNYAR, 2005). Foi mostrado que animais da espécie *Corvus moneduloides* se utilizam de ferramentas construídas a partir de ramos ou objetos manufaturados para a coleta de alimento e acredita-se que este conhecimento seja passado aos outros indivíduos através da aprendizagem social (WEIR *et al.*, 2002;

HUNT & GRAY, 2003). Outro corvídeo, *Pica pica*, mostrou o desenvolvimento do conhecimento de permanência de objeto relativamente mais jovem que qualquer outro organismo testado (POLLOK *et al.*, 2000). O conhecimento de permanência de objeto, conceito proposto por Piaget para seres humanos, é a habilidade de depreender sobre a existência continuada de objetos ainda que temporariamente não visíveis; em humanos se desenvolve até os dois anos de idade e seu processamento está relacionado a estruturas do lobo temporal medial, particularmente o hipocampo, e do córtex pré-frontal (nas aves o neostriado caudolateral), estruturas especialmente envolvidas no processamento das informações dos objetos e suas relações com o ambiente (POLLOK *et al.*, 2000).

Semelhanças e diferenças na aprendizagem e memória de espécies que evolutivamente divergiram há muito tempo atrás podem revelar mecanismos fundamentais sobre a retenção das informações nos encéfalos. As aves perfazem uma classe de vertebrados que partilhou um ancestral comum com os humanos há pelo menos 250 milhões de anos (JEFFERY & O'KEEFE, 2007). Porém, estudos de memória em aves são historicamente focados em modelos simples de aprendizagem associativa, que sustentam a noção de que estas seriam criaturas primariamente instintivas, dotadas de uma habilidade ínfima de memória e pequena flexibilidade comportamental (EMERY, 2006).

Segundo a visão clássica, formulada por EDINGER (1903 *apud* ABNC, 2005) no final do século XIX e início do século XX, a evolução do encéfalo seria baseada numa concepção de evolução progressiva e unilinear, com a adição de complexidade e capacidades cognitivas dos peixes a anfíbios, dos anfíbios a répteis e aves, destes a mamíferos, a primatas e, finalmente, a humanos – ascendendo de uma inteligência “inferior” a “superior” numa série cronológica. E, portanto, quase todo o telencéfalo das aves seria de origem estriatal, ou seja, corresponderia aos gânglios basais do encéfalo dos mamíferos, os quais regem funções básicas relacionadas a comportamentos espécie-específicos, como cuidado materno, comportamento sexual e alimentar; sendo que estas não possuiriam estruturas encefálicas correspondentes ao neocórtex dos mamíferos, responsável justamente pelas capacidades cognitivas ditas “superiores”, de flexibilidade comportamental (ABNC, 2005; EMERY, 2006). As aves possuiriam apenas um pequeno archicórtex, um córtex primitivo análogo ao hipocampo dos mamíferos, cuja função nos humanos é da consolidação das memórias declarativas e, em animais, na formação de “mapas cognitivos” do ambiente.

Atualmente, baseado em diversos estudos comportamentais, de ontogenia, lesões, conexões e expressões gênicas dos encéfalos, acredita-se que extensas regiões telencefálicas das aves, classicamente denominadas estriatais (ou seja, derivadas dos gânglios basais), são, de fato, de origem palial, assim como o são os córtices dos mamíferos (ABNC, 2005). Essa nova visão do encéfalo das aves pode levar a um novo entendimento de seus comportamentos, que passariam a ser explicados não mais somente como resultado de comportamento instintivo e condicionado, mas como uma adaptação à resolução de problemas sócio-ecológicos, similarmente aos mamíferos. Ao se admitir a existência de um tecido telencefálico nas aves de mesma origem palial que os córtices dos mamíferos, ampliam-se as possibilidades de discussão acerca das capacidades cognitivas na resolução dos problemas ambientais destes animais. Conforme discutido, o acúmulo de estudos em aves, como os aqui realizados com os beija-flores, tem mostrado capacidades cognitivas que não podem ser explicadas por simples condicionamento ou instinto.

Acredita-se que, apesar de organizados de maneira diferente - nas aves em núcleos e nos mamíferos em lâminas – esses substratos neurais de origem palial funcionariam de maneira semelhante, mas, em diferentes níveis de complexidade (ABNC, 2005). PEPPERBERG (1999) propôs uma interessante analogia com os computadores ao comparar os encéfalos das aves e mamíferos; os encéfalos dos mamíferos seriam como os IBM-PCs e das aves como os Apple Macintoshs: a organização e processamento são diferentes, mas os resultados (comportamentos) seriam similares.

O fato é que estudos em diferentes grupos filogenéticos, com histórias evolutivas e de nichos ecológicos distintos, têm levantado importantes questões acerca dos mecanismos de desenvolvimento do comportamento, contribuindo para um melhor entendimento dos mecanismos de formação da memória e da evolução do sistema nervoso como um todo.

Referências Bibliográficas

Capítulo 01. Introdução

BABB, S. & CRYSTAL, J. Episodic-like memory in the rat. **Current Biology** 16(13): 1317-1321, 2006.

BATESON, M.; HEALY, S. D. & HURLY, T. A. Context-dependent foraging decisions in Rufous Hummingbirds. **Proc. R. Soc. Lob. Biol. Sci.** 270: 1271-1276, 2003.

BECH, C.; ABE, A. S.; STEFFENSEN, J. F.; BERGER, M. & BICUDO, J. E. P. W. Torpor in three species of brazilian hummingbirds under semi-natural conditions. **The Condor** 90: 780-788, 1997.

BOWMAKER, J. K.; HEATH, L.A.; WILKIE, S.E. & HUNT, D.M. Visual pigments and oil droplets from six classes of photoreceptor in the retinas of birds. **Vision Research** 37(16): 2183-2194, 1997.

BROWN, G. S. & GASS, C. L. Spatial association learning by hummingbirds. **Animal Behaviour** 46: 487-497, 1993.

CARPENTER, F. L. & HIXON, M. A. A new function for torpor: fat conservation in a wild migrant hummingbird. **The Condor** 90: 373-378, 1988.

CLAYTON, N. S. & DICKINSON, A. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. **Nature** 395: 272-274, 1998.

COLLIAS, N. E. & COLLIAS, E. C. Anna's hummingbirds trained to select different colors in feeding. **The Condor** 70: 273-274, 1968.

DALMAZ, C. & NETTO, C. A. A memória. **Ciencia e Culura** 56(1): 30-31, 2004.

del HOYO, J.; ELLIOT, A. & SARGATAL, J. **Handbook of the Birds of The World**. Vol. 5: Barnowls to Hummingbirds. Linxs Edicions, Barcelona, 1999.

DERE, E.; HUSTON, J. P. & SILVA, M. A. S. Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. **Brain Research Protocols** 16(1-3): 10-19, 2005.

DIAMOND, J. M.; KARASOV, W. H.; PHAN, D. & CARPENTER, F. L. Digestive physiology is a determinant of foraging bout frequency in hummingbirds. **Nature** 320(6057): 62-63, 1986.

EICHENBAUM, H. The hippocampal system and declarative memory in humans and animals: experimental analysis and historical origins. In **Memory Systems 1994**; eds. Schacter, D.L. & Tulving, E., MIT, 1994.

FRUTUOSO, J. T. **Desenvolvimento de uma situação de condicionamento operante para estudos de Psicofísica Visual no beija-flor Eupetomena macroura-macroura**. Dissertação (Mestrado em Psicologia (Psicologia Experimental)) - Universidade de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientadora: Dora Selma Fix Ventura, 1995.

GALLO, M. Hippocampus, Temporal Context and Taste Memories. **Chem. Senses** 30 (1): i160–i161, 2005.

GREENEWALT, C. H. **Hummingbirds**. Dover Publications, Inc., New York, 1990.

GOLDSMITH, T. H. Hummingbirds see near ultraviolet light. **Science** 207(4432):786-788, 1980.

GOOD, M. & HONEY, R. C. Conditioning and contextual retrieval in hippocampal rats. **Behavioral Neuroscience** 105(4): 499-509, 1991.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10 ed. Guanabara Koogan S. A., 2002.

HAINSWORTH, F. R.; COLLINS, B. G. & WOLF, L. L. The function of torpor in hummingbirds. **Physiological Zoology** 50: 215-222, 1977.

HEALY, S. D. Ecological Specialization in the Avian Brain in **Neuroethological Studies of Cognitive and Perceptual Processes**. (Eds. Moss, C. F. & Shettleworth, S. J.) USA: Westview Press, 1996.

HENDERSON, J.; HURLY, T. A. & HEALY, S. D. Rufous hummingbirds' memory for flower location. **Animal Behaviour** 61: 981-986, 2001.

HENDERSON, J.; HURLY, T. A.; BATESON, M. & Healy, S. D. Timing in free-living rufous hummingbirds, *Selasphorus rufus*. **Current Biology** 16: 512-515, 2006.

HURLY, T. A. Spatial memory in rufous hummingbirds: memory for rewarded and non-rewarded sites. **Animal Behaviour** 51(1): 177-183, 1995.

HURLY, T. A. & HEALY, S. D. Memory for flowers in rufous hummingbird: location or visual cues? **Animal Behaviour** 51: 1149-1157, 1996.

HURLY, T. A. & HEALY, S. D. Cue Learning by Rufous Hummingbirds (*Selasphorus rufus*). Journal of Experimental Psychology: **Animal Behavior Processes** 28(2): 209-223, 2002.

JARRARD, L. E. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. **Behav. Neural Biol.** 60(1): 9-26, 1993.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J. H. & JESSEL, T. M. **Princípios da Neurociência**. 4 ed. Manole, SP, 2003.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2001.

MAREN, S. & HOLT, W. The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. **Behavioural Brain Research** 110: 97-108, 2000.

MILLER, R. S. & MILLER, R. E. Feeding activity and color preference of Ruby-throated hummingbirds. **The Condor** 73: 309-313, 1971.

MILLER, R. S.; TAMM, S.; SUTHERLAND, G. D. & GASS, C. L. Cues for orienting in hummingbird foraging: color and position. **Canadian Journal of Zoology** 63: 18-21, 1985.

O'KEEFE, J. & DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map: preliminary evidence from unity activity in the freely-moving rat. **Brain Research** 34: 171-175, 1971.

REIS, F.; SCHENKA, A. A.; MELO, L. L. & FERRARI, E. A. M. Role of the hippocampus in contextual memory after classical aversive conditioning in pigeons (*C. livia*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 32: 1127-1131, 1999.

RICHMOND, J. & COLOMBO, M. Hippocampal lesions, contextual retrieval, and autoshaping in pigeons. **Brain Research** 928(1-2): 60-68, 2002.

ROBERTS, W. M. Hummingbirds' nectar concentrations preferences at low volume: the importance of time scale. **Animal Behaviour** 52: 361-370, 1996.

RUSCHI, A. A cor preferida pelos beija-flores e a porcentagem de açúcar preferida pelos mesmos na solução de água açucarada. **Boletim do Museu de Biologia Prof. Mello Leitão - Zoologia** 22: 1-5, 1953.

SCHACTER, D. L. & TULVING, E. **What are the memory systems of 1994?** In *Memory Systems 1994*; eds. Schacter, D.L. & Tulving, E., MIT, 1994.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Ed. Nova Fronteira S.A., Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

STILES, F. G. Taste preferences, color preferences and flower choice in hummingbirds. **The Condor** 78: 10-26, 1976.

TAMM, S & GASS, C. L. Energy intake rates and nectar concentration preferences by hummingbirds. **Oecologia (Berlim)** 70:20-23, 1986.

THORPE, C. M.; JACOVA, C. & WILKIE, D. M. Some pitfalls in measuring memory in animals. **Neuroscience and Behavioral Reviews** 28: 711-718, 2004.

TULVING, E. Episodic memory and common sense: how far apart? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B- Biological Sciences** 356: 1505-1515, 2001

VOROBYEV, M. Coloured oil droplets enhance colour discrimination. **Proc. R. Soc. Lond. B** 270: 1255-1261, 2003.

WILLIAMSON, S. **A field guide to hummingbirds of North América**. Houghton Mifflin Company, Boston, NY, USA, 2002.

XAVIER, G. F. Memória espacial no rato. In **Etologia: de animais e de homens**. ADES, C. (org.), São Paulo: EDICON, 1986.

XAVIER, G. F. A modularidade da memória. **Psicologia-USP** 4(1-2), 61-115, 1993.

XAVIER, G. F. & MAGILA, M. C. Hipocampo e mapas cognitivos: estudos em animais de laboratório e pacientes amnésicos. In *Tempo e espaço: um enfoque sobre hipocampo e cognição ambiental*. **Revista de Estudos Avançados** n. 26, 1996.

ZENTALL, T. R.; CLEMENT, T. S.; BHATT, R. S. & ALLEN, J. Episodic-like memory in pigeons. **Psychonomic Bulletin & Review** 8(4): 685-690, 2001.

Capítulo 02. Concentração Preferida de Sacarose

BAKER, H. G. Sugar concentrations in nectars from hummingbird flowers. *Biotropica* 7(1): 37-41, 1975.

BOLTEN, A. B. & FEINSINGER, P. Why do hummingbird flowers secrete dilute nectar? *Biotropica* 10(4): 307-309, 1978.

FREITAS, L. & SAZIMA, M. Nectar features in *Esterhazyia macrodonta*, a hummingbird-pollinated Scrophulariaceae in southeastern Brazil. *J. Plant Research* 114: 187-191, 2001.

HAISWORTH, F. R. & WOLF, L. L. Nectar characteristics and food selection by hummingbirds. *Oecologia* 25(2): 101-113, 1976.

HEYNEMAN, A. J. Optimal sugar concentrations of floral nectars – dependence on sugar intake efficiency and foraging costs. *Oecologia* 60: 198-213, 1983.

HEIRINCH, B. Energetics of pollination. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 6: 139-170, 1975.

HEIRINCH, B. & RAVEN, P. H. Energetics and pollination ecology. *Science* 176:597-602, 1972.

HOUSTON, A. I. & KRAKAUER, D. C. Hummingbirds as net rate maximisers. *Oecologia* 94: 135-138, 1993.

KINGSOLVER, J. G. & DANIEL, T. L. Mechanical determinants of nectar feeding strategy in hummingbirds: energetic, tongue morphology, and licking behavior. *Oecologia* 60: 214-226, 1983.

McDADE, L. A. & WEEKS, J. A. Nectar in hummingbird-pollinated neotropical plants. I: Patterns of production and variability in 12 species. *Biotropica* 36(2): 196-215, 2004.

MENDONÇA, L. B. & ANJOS, L. dos. Flower morphology, néctar features, and hummingbird visitation to *Palicourea crocea* (Rubiacea) in the Upper Paraná River floodplain, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 78(1): 45-57, 2006.

MONTGOMERIE, R. D.; EADIE, J. M. & HARDER, L. D. What do foraging hummingbirds maximize? *Oecologia* 63:357-363, 1984.

PETIT, S. & FREEMAN, C. E. Nectar production of two sympatric specie of columnar cacti. **Biotropica** 29(2): 175-183, 1997.

PLOWRIGHT, R. C. Corolla depth and nectar concentration: an experimental study. **Canadian Journal of Botany** 65: 1011-1013, 1987.

PYKE, G. H. Optimal foraging n hummingbirds: testing the marginal value theorem. **American Zoology** 18: 739-752, 1978.

PYKE, G. H. & WASER, N. M. The production of dilute nectars by hummingbird and honeyeater flowers. **Biotropica** 13(4): 260-270, 1981.

RUSCHI, A. A cor preferida pelos beija-flores e a porcentagem de açúcar preferida pelos mesmos na solução de água açucarada. **Boletim do Museu de Biologia Prof. Mello Leitão - Zoologia** 22: 1-5, 1953.

ROBERTS, W. M. Hummingbirds' nectar concentrations preferences at low volume: the importance of time scale. **Animal Behaviour** 52: 361-370, 1996.

STILES, F. G. Taste preferences, color preferences and flower choice in hummingbirds. **The Condor** 78: 10-26, 1976.

SUAREZ, R. K. & GASS, C. L. Hummingbird foraging and the relation between bioenergetics and behaviour. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular and Integrative Physiology** 133(2): 335-343, 2002.

TAMM, S & GASS, C. L. Energy intake rates and nectar concentration preferences by hummingbirds. **Oecologia (Berlim)** 70:20-23, 1986.

VAN RIPER, W. Hummingbird feeding preferences. **Auk** 75: 100-101, 1958.

Capítulo 03. Memória Espacial

ARMSTRONG, D. P.; GASS, C. L. & SUTHERLAND, G. D. Should foragers remember where they've been? Explorations of a simulation model based on the behavior and energetics of territorial hummingbirds. *In* **Foraging Behavior**, eds. Kamil, A. C.; Krebs, J. R. & Pullian, H. R. NY: Plenum Press, 1987.

BAUM, K. A. & GRANT, W. E. Hummingbird foraging behavior in different patch types: simulation of alternative strategies. **Ecological Modelling** 137: 201-209, 2001.

BROWN, G. S. & GASS, C. L. Spatial association learning by hummingbirds. **Animal Behaviour** 46: 487-497, 1993.

COLE, S.; HAINSWORTH, F. R.; KAMIL, A. C.; MERCIER, T. & WOLF, L. L. Spatial learning as an adaptation in hummingbirds. **Science** 217: 655-657, 1982.

COLLIAS, N. E. & COLLIAS, E. C. Anna's hummingbirds trained to select different colors in feeding. **The Condor** 70: 273-274, 1968.

GASS, C. L. & MONTGOMERIE, R. D. Hummingbird foraging behavior: decision-making and energy regulation. *In*: **Foraging Behavior: Ecological, Ethological and Psychological Approaches** (ed. by A. C. Kamil & T. D. Sargent), pp. 159-194, Garland STPM Press, New York, 1981.

HEALY, S. D. & HURLY, T. A. Rufous Hummingbirds' (*Selasphorus rufus*) Memory for Flowers: Patterns or Actual Spatial Locations? **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes** 24(4): 196-404, 1998.

HURLY, T. A. Spatial memory in rufous hummingbirds: memory for rewarded and non-rewarded sites. **Animal Behaviour** 51(1): 177-183, 1995.

HURLY, T. A. & HEALY, S. D. Memory for flowers in rufous hummingbird: location or visual cues? **Animal Behaviour** 51: 1149-1157, 1996.

HURLY, T. A. & HEALY, S. D. Cue Learning by Rufous Hummingbirds (*Selasphorus rufus*). Journal of Experimental Psychology: **Animal Behavior Processes** 28(2): 209-223, 2002.

MILLER, R. S. & MILLER, R. E. Feeding activity and color preference of Ruby-throated hummingbirds. **The Condor** 73: 309-313, 1971.

MILLER, R. S.; TAMM, S.; SUTHERLAND, G. D. & GASS, C. L. Cues for orienting in hummingbird foraging: color and position. **Canadian Journal of Zoology** 63: 18-21, 1985.

O'KEEFE, J. & NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford University Press, Oxford, 1978.

OLTON, D. S. & SAMUELSON, R. J. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes** 2: 97-116, 1976.

SUTHERLAND, G. D. & GASS, C. L. Learning and remembering of spatial patterns by hummingbirds. **Animal Behaviour** 50:1237-1286, 1995.

Capítulo 04. Memória Espaço-Temporal

BIEBACH, H.; GORDIJN, M. & KREBS, J. R. Time-and-place learning by garden warblers, *Sylvia borin*. **Animal Behaviour** 37: 353–360, 1989.

BIEBACH, H., FALK, H. & KREBS, J. R. The Effect of Constant Light and Phase Shifts on a Learned Time-Place Association in Garden Warblers (*Sylvia borin*): Hourglass or Circadian Clock? **Journal of Biological Rhythms** 6(4): 353-365, 1991.

BIEBACH, H.; KREBS, J. R. & FALK, H. Time–place learning, food availability and the exploitation of patches in garden warblers, *Sylvia borin*. **Animal Behaviour** 48: 273–284, 1994.

CAMMAERTS, M. C. Classical conditioning, temporal learning and spatial learning in the ant *Myrmica sabuleti*. **Biologia Bratislava** 59(2): 243-256, 2004.

CARR, J. A. R.; TAN, A. O. & WILKIE, D. M. Further evidence that rats use ordinal timing in a daily time-place task. **Behavioural Processes** 48:35-48, 1999a.

CARR, J. A. R. & WILKIE, D. M. Rats are reluctant to use circadian timing in a daily time-place task. **Behavioural Processes** 44:287-299, 1999b.

DELICIO, H. C.; LUCHIARI, A. C.; BARRETO, R. E. & MARCONDES, A. L. Testing time-place learning in the cichlid fish *Nile tilapia*. **Journal of Ethology** 24:195-200, 2006.

FALK, H.; BIEBACH, H. & KREBS, J. R. Learning a time–place pattern of food availability: a comparison between an insectivorous and a granivorous weaver species (*Ploceus bicolor* and *Euplectes hordeaceus*). **Behav. Ecol. Sociobiol.** 31: 9–15, 1992.

GÓMEZ-LAPLAZA, L. M. & MORGAN, E. Time-place learning in the cichlid angelfish, *Pterophyllum scalare*. **Behavioural Processes** 70: 177-181, 2005.

KREBS J. R. & BIEBACH, H. Time-place learning by garden warblers (*Sylvia borin*): route or map? **Ethology** 83(3): 248-256, 1989.

MISTLLBERGER, R. E.; de GROOT, M. H. M.; BOSSERT, J. M. & MARCHANT, E. G. Discrimination of circadian phase in intact and suprachiasmatic nuclei-ablated rats. **Brain Research** 739: 12-18, 1996.

MOORE-EDE, M.C.; SULZMAN, F.M. & FULLER, C.A. **The Clocks that Time us**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 1982.

MOORE, D. Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms. **Journal of Insect Physiology** 47:843-857, 2001.

PIZZO, M. J. & CRYSTAL, J. D. Representation of time in time-place learning. **Animal Learning & Behavior** 30(4): 387-393, 2002.

PETRUSO, E. J.; FUCHS, T. & BINGMAN, V. P. Time-space learning in homing pigeons (*Columba livia*): orientation to an artificial light source. **Animal Cognition** 10 (2): 181-188, 2007.

REEBS, S. G. Time-place learning in golden shiners (Pisces: Cyprinidae). **Behavioural Processes** 36: 253-262, 1996.

REEBS, S. G. Time-place learning based on food but not on predations risk in a fish, the inanga (*Galaxia maculatus*). **Ethology** 105: 361-371, 1999.

SAKSIDA, L. M. & WILKIE, D. M. Time-of-day discrimination by pigeons, *Columba livia*. **Anim. Learning Behav.** 22: 43-154, 1994.

SCHATZ, B.; LACHAUD, J. P. & BEUGNON, G. Spatio-temporal learning by the ant *Ectatomma ruidum*. **The Journal of Experimental Biology** 202, 1897-1907, 1999.

TUREK, F. W. Circadian Rhythms. **Recent Progress in Hormone Research** 49: 43-89, 1994.

VALENTINUZZI, V. S. Ritmos circadianos e memória espacial-temporal em aves e mamíferos envolvem processos de adaptação distintos? **Projeto de Pesquisa** apresentado para concurso para docente do Depto. de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP, 2002.

WENGER, D.; BIEBACH, H. & KREBS, J. R. Free running circadian rhythm of a learned feeding pattern in starlings. **Naturwissenschaften** 78: 87–89, 1991.

WILKIE, D. M.; CARR, J. A. R.; GALLOWAY, J.; PARKER, K. J. & YAMAMOTO, A. Conditional time–place learning. **Behavioural Processes** 40: 165–170, 1997.

WILKIE, D. M.; CARR, J. A. R.; SIEGENTHALER, A.; LINGER, B.; LIU, M. & KWOK, M. Field observations of time–place behaviour in scavenging birds. **Behavioural Processes** 38: 77–88, 1996.

WILKIE, D. M.; SAKSIDA, L. M.; SAMSON, P. & LEE, A. Properties of time–place learning by pigeons, *Columbia livia*. **Behavioural Processes** 31: 39–56, 1994.

WILKIE, D. M. & WILLSON, R. J. Time–place learning by pigeons, *Columba livia*. **J. Exp. Anal. Behav.** 57: 145–158, 1992.

WILKIE, D. M. & WILLSON, R. J. More evidence of robust spatial associative memory in the pigeon, *Columba livia*. **Anim. Learn. Behav.** 23: 69–75, 1995.

WRIGHT, K. O tempo da nossa vida. **Scientific American Brasil**, outubro, ano 1, no. 5, 2002.

Capítulo 05. Discussão Geral

ABNC – The Avian Brain Nomenclature Consortium. Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. **Nature Reviews Neuroscience** 6:151-159, 2005.

ALTSHULER, D. L. & NUNN, A. M. Observational learning in hummingbirds. **The Auk** 118(3): 795–799, 2001.

BABB, S. & CRYSTAL, J. Episodic-like memory in the rat. **Current Biology** 16(13): 1317-1321, 2006.

BATESON, M.; HEALY, S. D. & HURLY, T. A. Context-dependent foraging decisions in Rufous Hummingbirds. **Proc. R. Soc. Lob. Biol. Sci.** 270: 1271-1276, 2003.

BUGNYAR, T. & HEINRICH, B. Ravens, *Corvus corax*, differentiate between knowledgeable and ignorant competitors. **Proceedings of the Royal Society B** 272: 1641–1646, 2005.

CLAYTON, N. S. & DICKINSON, A. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. **Nature** 395: 272-274, 1998.

DERE, E.; HUSTON, J. P. & SILVA, M. A. S. Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. **Brain Research Protocols** 16(1-3): 10-19, 2005.

EICHENBAUM, H. The hippocampal system and declarative memory in humans and animals: experimental analysis and historical origins. In **Memory Systems 1994**; eds. Schacter, D.L. & Tulving, E., MIT, 1994.

EMERY, N. J. Cognitive ornithology: the evolution of avian intelligence. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** 361: 23-43, 2006.

EMERY, N. J. & CLAYTON, N. S. Effects of experience and social context on prospective caching strategies by scrub jays. **Nature** 414: 443–446, 2001.

EPSTEIN, R., LANZA, R. P. & SKINNER, B. F. Symbolic communication between two pigeons (*Columba livia domestica*). **Science** 207: 543-545, 1980.

FLAHERTY C. F. & CHECKE, S. Anticipation of incentive gain. **Animal Learning & Behavior** 10: 177-182, 1982.

GAHR, M. Neural song control system of hummingbirds: comparison to swifts, vocal learning (songbirds) and nonlearning (suboscines) passerines, and vocal learning (budgerigars) and nonlearning (dove, owl, gull, quail, chicken) nonpasserines. **The Journal of Comparative Neurology** 426: 182-196, 2000.

HEALY, S. D. Ecological Specialization in the Avian Brain in **Neuroethological Studies of Cognitive and Perceptual Processes**. (eds. Moss, C. F. & Shettleworth, S. J.) USA: Westview Press, 1996.

HEINRICH, B. & BUGNYAR, T. Testing problem solving in Ravens: string-pulling to reach food. **Ethology** 111: 962—976, 2005.

HENDERSON, J.; HURLY, T. A.; BATESON, M. & HEALY, S. D. Timing in free-living rufous hummingbirds, *Selasphorus rufus*. **Current Biology** 16: 512-515, 2006.

HUNT, G. R. & GRAY, R. D. Diversification and cumulative evolution in New Caledonian crow tool manufacture. **Proc. R. Soc. Lond. B** 270, 867–874, 2003.

JEFFERY, K. & O'KEEFE, J. Worm holes and avian space-time. **Nature** 395(6699):215-6, 1998.

KNUDSEN, E. I. Instructed learning in the auditory localization pathway of the barn owl. **Nature** 417: 322–328, 2002.

LUBINSK, D. & MacCORQUODALE, K. 'Symbolic communication' between two pigeons (*Columba livia*) without unconditioned reinforcement. **J. Comp. Psychol.** 98, 372–380, 1984.

LANZA, R. P.; STARR, J. & SKINNER, B. F. 'Lying' in the pigeon. **J. Exp. Anal. Behav.** 38, 201–203, 1982.

LUBOW, R. E. High-order concept formation in the pigeon. **J. Exp. Anal. Behav.** 21, 475–483, 1974.

PEPPERBERG, I. M. **The Alex studies: cognitive and communicative abilities of Grey parrots.** Cambridge, MA: Harvard University Press, 1999.

PEPPERBERG, I. M. & GORDON, J. D. Number comprehension by a grey parrot (*Psittacus erithacus*), including a zero-like concept. **Journal of Comparative Psychology** 119 (2): 1997-209, 2005.

PEPPERBERG, I. M. & SHIVE, H. Simultaneous development of vocal and physical object combinations by a grey parrot (*Psittacus erithacus*): bottle caps, lids, and labels. **J. Comp. Psych.** 115: 376–384, 2001.

POLLOK, B.; PRIOR, H. & GÜNTÜRKÜN, O. Development of object-permanence in the food-storing magpie (*Pica pica*). **J. Comp. Psychol.** 114: 148–157, 2000.

VON FERSEN, L. & DELIUS, J. D. Long-term retention of many visual patterns by pigeons. **Ethology** 82, 141–155, 1989.

VON FERSEN, L.; WYNNE, C. D. L.; DELIUS, J. D. & STADDON, J. E. R. Transitive inference formation in pigeons. **J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.** 17, 334–341, 1992.

WATANABE, S.; SAKAMOTO, J. & WAKITA, M. Pigeons' discrimination of paintings by Monet and Picasso. **J. Exp. Anal. Behav.** 63, 165–174, 1995.

WEIR, A. A.; CHAPPELL, J. & KACELNIK, A. Shaping of hooks in New Caledonian crows. **Science** 297: 981, 2002.

ZENTALL, T. R.; CLEMENT, T. S.; BHATT, R. S. & ALLEN, J. Episodic-like memory in pigeons. *Psychonomic Bulletin & Review* 8(4): 685-690, 2001.