UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

LARISSA CERDEIRA TROITINO

Feromônio 'No entry' em *Monomorium pharaonis*: Réplica experimental

São Paulo

2017

LARISSA CERDEIRA TROITINO

Feromônio 'No entry' em *Monomorium pharaonis*: Réplica experimental

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia
da Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Psicologia

Área de Concentração:

Psicologia Experimental

Orientador: Prof^a Dr^a Emma Otta

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cerdeira Troitiño, Larissa

Feromônio 'No entry' em *Monomorium pharaonis*: Réplica experimental /
Larissa Cerdeira Troitiño; orientador EMMA OTTA. - São Paulo, 2017.
65 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Psicologia Experimental)
Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2017.

1. *Monomorium pharaonis*. 2. Feromônio repelente. 3. no entry. 4.
Forrageamento. 5. Réplica experimental. I. OTTA, EMMA, orient. II. Título.

Nome: Troitiño, Larissa Cerdeira

Título: Feromônio 'No entry' em *Monomorium pharaonis*: Réplica experimental

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Psicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo investimento e carinho durante toda a vida. Aos meus amigos de coração, presentes nos bons e maus momentos. A todos aqueles que de alguma forma contribuíram emocionalmente para que esse trabalho ganhasse vida, humanos ou não.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Emma Otta por aceitar orientar esse trabalho. Agradeço pela contribuição na minha formação, profissional e pessoal, e por ser uma orientadora extremamente companheira, compreensiva e preocupada com seus alunos.

Ao Prof. Dr. Odair Correa Bueno e a todos do Centro de Estudos de Insetos Sociais da UNESP - Rio Claro por terem me recebido de portas abertas no laboratório, por terem cedido as colônias para o experimento e por toda a inestimável ajuda.

Ao Vinicius Frayze David pela ajuda em toda a parte estatística desse trabalho e por todas as sugestões e discussões, sempre muito produtivas.

Ao Prof. Dr. Nicolas Châline por todo o conhecimento compartilhado sobre os insetos sociais.

Ao Prof. Dr. Pedro Leite Ribeiro, por ter sido um dos primeiros a apoiar minha ideia de replicar o experimento 'No entry' e por toda a ajuda no começo desse trabalho.

Aos funcionários do IP-USP, especialmente Noel Augusto Santos, Édila Aparecida da Silva e Jacob de Oliveira (*in memorian*). Sem o trabalho deles na confecção dos materiais e cuidados com o formigueiro esse trabalho jamais seria possível.

À Gisele Polito, Laila Santim Mureb e Gabriela de Brito Chaves, por terem sido estagiárias extremamente esforçadas e comprometidas e me ajudarem durante a execução de partes desse trabalho.

À Janiele Pereira da Silva e Lia Matos Viegas, por toda a paciência durante esses anos. Por me ajudarem na realização dos experimentos, por lerem meus textos um milhão de vezes, por me ajudarem a terminar essa dissertação. Acima de tudo, por toda a amizade e companheirismo durante essa jornada. Vocês com certeza foram a melhor parte desse mestrado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Sinais químicos são amplamente usados pelas formigas em diversos contextos. Uma das funções mais importantes, dentre outras, é na marcação de trilhas de forrageamento. Essas trilhas são usadas na comunicação e amplamente descritas na literatura como tendo caráter positivo, servindo para atrair e recrutar novos indivíduos para determinadas tarefas. Os mecanismos pelos quais as formigas modulam as características dessas trilhas são diversos, mas um dos mais interessantes é o 'No entry'. Ele foi descrito apenas para a espécie *Monomorium pharaonis* e consiste num feromônio repelente que serve para marcar caminhos não recompensados ou que não são mais de interesse. Por ser um tipo de feromônio pouco estudado, o objetivo desse trabalho foi replicar o experimento original em *Monomorium pharaonis*. Também nos propusemos a fazer alguns experimentos adicionais com o objetivo de testar o controle usado. Os resultados obtidos não corroboram os do experimento original e apontam para a não existência do feromônio 'No entry'. Apesar da quantidade de *U-turns* ter sido semelhante à encontrada no experimento original, a proporção de formigas escolhendo o lado 'No entry' e o lado controle foi de 48% e 52%, ou seja, a proporção esperada segundo a aleatoriedade. Sugerimos algumas hipóteses para as diferenças encontradas, incluindo o controle usado. Destacamos também a importância de se replicar os experimentos na ciência antes de assumi-los como verdade absoluta, como forma de sugerir melhorias aos protocolos experimentais e garantir que futuros experimentos e hipóteses baseadas em um experimento inédito tenham mais embasamento. Também convidamos os estudantes e pesquisadores de comportamento animal a abraçarem a importância da replicação, não como forma de contestar os dados obtidos por outros grupos, mas como exercício importante no que diz respeito à padronização de protocolos e sugerir melhorias para que os dados obtidos, que podem ser discrepantes à primeira vista, sejam comparáveis e ganhem mais poder estatístico e, conseqüentemente, mais valor dentro da ciência.

ABSTRACT

Chemical signs are widely used by ants in many situations. Among others, one of the most important is in foraging trails. These trails are used in communication and extensively described in the literature as having a positive character, serving to attract and recruit new individuals for certain tasks. There are many mechanisms by which the ants modulate the trails' characteristics, but one of the most interesting is the 'No entry' pheromone. It has been described only for *Monomorium pharaonis* and consists of a repellent pheromone that serves to mark unrewarded paths or paths that are no longer of interest. Because it is a type of pheromone less studied, our aim was to replicate the original experiment in *Monomorium pharaonis*. We also set out to do some additional experiments to test the control. The results do not corroborate those of the original experiment and point to the nonexistence of the 'No entry' pheromone. Although the number of U-turns was similar to the original experiment, the proportion of ants choosing the 'No entry' side and the control side was 48% and 52%, that is, the expected proportion according to randomness. We suggest some hypotheses for the differences found, including the control. We also emphasize the importance of replicating experiments in science before assuming them as absolute truth, as a way of suggesting improvements to experimental protocols and to ensure that future experiments and hypotheses based on a new result are more grounded. We also invite animal behavior researchers to embrace the importance of replication, not to challenge data obtained by other groups, but as an important exercise in standardization of protocols and suggest improvements so that the data obtained, which may be discrepant at first glance, be comparable, and gain more statistical power and, consequently, more value within science.

SUMÁRIO

1 Introdução	5
1.1 Tomada de decisão individual e coletiva	7
1.2 Sinais químicos.....	12
2 Objetivos	18
3 Hipóteses	18
4 Materiais e Métodos	18
4.1 Sujeitos.....	18
4.2 Aparato Experimental – Ponte de acrílico.....	18
4.3 Limpeza do aparato	20
4.4 Protocolo Experimental – No Entry	21
4.4.1 Parte I – Colônia A (Marcadora).....	21
4.4.2 Parte II – Colônia B (Teste).....	21
4.4.3 Parte III – Experimento na colônia Teste	22
4.5 Protocolo Experimental – Teste de Controles.....	24
4.5.1 Controle I – Marcação territorial X Marcação positiva	24
4.5.2 Controle II – Marcação territorial X Marcação neutra	24
4.5.3 Controle III – Marcação territorial X Marcação territorial	25
4.6 Análise estatística.....	25
5 Resultados	26
5.1 Réplicas do experimento no entry	26
5.2 Réplicas do experimento controle	31
6 Discussão.....	37
REFERÊNCIAS.....	42
APÊNDICE A.....	47
APÊNDICE B.....	61
APÊNDICE C	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ponte de acrílico usada nos experimentos com suas respectivas medidas.....	19
Figura 2 – Montagem usada no momento do experimento	20
Figura 3 - Papéis posicionados na bifurcação da ponte	21
Figura 4 - Fluxograma de tomada de decisão	23
Figura 5 - Comparação do fluxo de formigas em cada braço na colônia teste durante a parte inicial do experimento (comida em ambos os lados).....	26
Figura 6 - Escolhas feitas pelas formigas da colônia teste na Réplica 1	27
Figura 7 - Escolhas feitas pelas formigas da colônia teste na Réplica 2.....	27
Figura 8 - Escolhas feitas pelas formigas da colônia teste na Réplica 3.....	27
Figura 9 - Probabilidades estimadas de escolha em função do lado antenado	30
Figura 10 - Comparação do fluxo de formigas em cada braço na colônia teste durante a parte inicial de cada controle (comida em ambos os lados).....	32
Figura 11 - Escolhas feitas pelas formigas da colônia teste no Controle 1 (Marcação territorial x Marcação positiva).....	32
Figura 12 - Escolhas feitas pelas formigas da colônia teste no Controle 2 (Marcação territorial x Marcação neutra).....	33
Figura 13 - Escolhas feitas pelas formigas da colônia teste no Controle 3 (Marcação territorial x Marcação territorial).....	33
Figura 14 – Labirinto usado para o experimento piloto com <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	62
Figura 15 - Distribuição do fluxo nos dois braços da colônia teste durante a primeira parte do experimento.....	62
Figura 16 - Distribuição do fluxo nos dois braços da colônia marcadora durante a primeira parte do experimento.....	63
Figura 17 - Número de escolhas para cada um dos lados (eixo positivo) e número de <i>U-turns</i> em cada um dos lados (eixo negativo)	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número total e porcentagem de indivíduos que escolheram um lado ou fizeram <i>U-turn</i> em cada réplica	28
Tabela 2 - Associação entre lado antenado e a escolha feita pelo indivíduo ...	29
Tabela 3 - Associação entre lado antenado e a escolha feita pelo indivíduo separada por réplica.....	29
Tabela 4 - Associação do total de escolhas em função do lado antenado	30
Tabela 5 - Distribuição de escolhas nos momentos pré e pós inversão.....	31
Tabela 6 - Associação entre antenação e escolha dos indivíduos no Controle 1	34
Tabela 7 - Associação entre antenação e escolha dos indivíduos no Controle 2	34
Tabela 8 - Associação entre antenação e escolha dos indivíduos no Controle 3	35
Tabela 9 - Associação entre escolha e os momentos pré e pós inversão no Controle 3.....	36
Tabela 10 - decisão de cada formiga na segunda parte do experimento	64

1 Introdução

Formigas são insetos eussociais. A definição de eussocialidade implica na existência das três características a seguir: 1) duas ou mais gerações se sobrepõe na sociedade; 2) adultos tomam conta dos jovens e; 3) adultos são divididos em castas reprodutivas e não reprodutivas (Wilson, 1971). Com a existência de uma casta não reprodutiva, que cuida apenas da prole alheia em detrimento de sua própria aptidão, existe nas formigas um comportamento que poderia ser definido como altruísta. A existência da eussocialidade nas formigas é inclusive abordada na obra seminal de Darwin, *A origem das espécies* (1859), tendo o autor dedicado um capítulo especial inteiro apenas para tentar “[...] explicar como espécies cruzadas umas com outras ficam estéreis ou produzem descendentes estéreis, enquanto que as variedades cruzadas umas com outras tornam-se fecundas” e, embora tenha conseguido responder a todas as questões levantadas, ele deixa claro que o caso particular das formigas é muito complexo e parece contrário à sua teoria, conforme cita em seu capítulo de conclusão:

Há, deve reconhecer-se, casos particulares difíceis que parecem contrários à teoria da seleção natural; um dos mais curiosos é, sem dúvida, a existência, no mesmo formigueiro, de duas ou três castas definidas de obreiras ou fêmeas estéreis. (Darwin, 1859, p. 434)

A dificuldade dele residia no fato dos indivíduos sexuais (fêmeas e machos) serem morfologicamente muito diferentes da classe que ele chama de “neutros”, ou seja, operárias que não se reproduzem. Afinal, se as características são passadas de pai para filho, como poderiam operárias estéreis passar e manter suas características ao longo das gerações se não deixam descendentes diretos? Defendendo sua teoria, Darwin argumenta:

Não vejo, pois, grande dificuldade em supor que um caráter termina por se encontrar em relação ao estado de esterilidade que caracteriza alguns membros das comunidades de insetos; a verdadeira dificuldade consiste em explicar como pôde a seleção natural acumular semelhantes modificações correspondentes de estruturas. Insuperável à primeira vista, esta dificuldade diminui e desaparece mesmo, lembrando que a seleção que se aplica tanto à família como ao indivíduo, e pode deste modo atingir-se o fim colimado. (Darwin, 1859, p. 253)

Embora estivesse convencido de que sua teoria estava certa, Darwin pareceu perceber que existia uma lacuna em sua explicação, que posteriormente

foi elucidada pelos trabalhos de Hamilton, em 1964, sobre seleção de parentesco (Hamilton, 1964). Com o avanço dos estudos sobre genética, Hamilton sugeriu que a capacidade reprodutiva de membros geneticamente relacionados (parentes) influencia a aptidão total de um indivíduo assexuado, ou seja, a capacidade reprodutiva deste indivíduo. O cálculo da aptidão total se dá pela soma de aptidão direta e indireta, sendo que a aptidão indireta leva em conta o grau de parentesco de outros membros com o indivíduo em questão. Quanto maior o grau de parentesco com parentes com capacidade reprodutiva, maior a aptidão indireta do indivíduo em questão. Assim sendo, um indivíduo não precisaria deixar necessariamente descendentes para garantir que suas características sejam passadas para as próximas gerações, basta apenas garantir que seus sobrinhos – que são indivíduos com características geneticamente próximas – tenham sucesso reprodutivo. Numa comunidade de formigas, em que as operárias são todas irmãs, elas podem compartilhar, em média, 75% dos genes, enquanto compartilham apenas 50% dos genes com os pais.

Assim sendo, “ajudar” seus irmãos, ou seja, ter comportamentos altruístas, teria um benefício a longo prazo para o indivíduo estéril.

Voltando às principais definições de eussocialidade, uma característica distintiva muito importante na maioria dos insetos sociais é a divisão de trabalho, pois grande parte do sucesso ecológico do grupo é devido a essa característica. Podemos definir a divisão de trabalho como (a) diferentes atividades realizadas simultaneamente por um grupo de indivíduos e (b) esse grupo de indivíduos é especialista naquele subconjunto de tarefas (Robinson, 1992; Beshers et al, 2001).

Em *Atta sexdens* encontra-se um dos padrões mais complexos da divisão de trabalho dentre todas as formigas, possivelmente com as castas filogeneticamente mais avançadas. Essa divisão em castas foi extensivamente descrita no estudo clássico de Wilson (1980), em que ele faz uma estimativa da existência de quatro castas (Jardineiras/Enfermeiras, Generalistas que ficam dentro do ninho, Forrageadoras e Soldados), das quais três são subdivididas em castas temporais, somando um total de pelo menos sete castas. No mesmo

estudo também distingue tarefas fixas (que são realizadas por conjunto de operárias de idade e tamanho relativamente limitados) e tarefas flexíveis (que são realizadas por conjuntos de operárias que variam em tamanho (e talvez idade)). A fidelidade a uma determinada tarefa, dentro dessa divisão, também foi estudada por Constatino, Ribeiro e Helene (2016).

Embora o assunto não esteja totalmente esclarecido, muitos modelos foram criados para tentar explicar as causas da divisão de trabalho nos insetos sociais (Beshers et al, 2001), como os modelos de limiar de resposta, auto-reforço, inibição social e etc. O ponto comum entre todos estes modelos é que eles se baseiam no conceito de auto-organização. Segundo Camazine, 2003, a auto-organização pode ser definida como um processo em que o padrão a nível global do sistema emerge exclusivamente das numerosas interações entre os componentes básicos que o compõem. Como consequência, as regras que especificam as interações entre os componentes do sistema são executadas com base exclusiva nas informações locais, sem referência ao padrão global ou presença de um líder.

Bonabeau et al. (1997) discutem ainda alguns componentes importantes para o surgimento da auto-organização: feedback positivo (amplificação), feedback negativo, que pode ser na forma de exaustão, saturação ou competição; amplificação de flutuações, com surgimento de padrões apesar da aleatoriedade, embora a aleatoriedade seja crucial, uma vez que permite a descoberta de novas soluções; e as interações múltiplas, pois auto-organização não exclui a existência de outros fatores como assinaturas químicas individuais ou memória individual.

Além disso, a auto-organização não necessita de indivíduos idênticos e pode funcionar ainda mais eficientemente quando os indivíduos pertencem a classes diferentes ou apresentam limiares diferentes de resposta a diferentes estímulos.

1.1 Tomada de decisão individual e coletiva

Em uma colônia podem existir milhares de indivíduos que tomam decisões com base em algumas regras como, por exemplo, seguir uma trilha marcada por feromônio ou não.

Dessa forma, a interação dos processos individuais atrelados ao contexto ambiental (Roces, 2002) promove o surgimento de processos coletivos que permitem o bom funcionamento da colônia (Detrain & Deneubourg, 2008). Essa tomada de decisão coletiva ocorre em diversas situações diante de um potencial problema a ser resolvido: por exemplo, escolha de local para construção de ninho, descarte de lixo, manutenção de um nível adequado de umidade da colônia, etc. Estes exemplos são dados para ilustrar os tipos de problemas enfrentados e as soluções que vem sendo desvendadas por pesquisadores em laboratório.

Apesar de uma longa história de investigação científica, só agora estamos começando a decifrar a relação entre propriedades dos indivíduos e do grupo. Este esforço interdisciplinar está começando a revelar os princípios subjacentes da tomada de decisão coletiva em grupos animais, demonstrando como interações sociais, estado individual, modificação ambiental e processos de amplificação e decaimento de informação podem desempenhar um papel no ajuste de respostas adaptativas (Couzin, 2009).

Por exemplo, quando é necessário escolher um local para construção do ninho, formigas podem se basear em informações individuais (um indivíduo visita dois locais e escolhe o melhor) ou coletivas (a maioria das formigas visita apenas um local, mas o recrutamento ocorre com maior eficiência para o melhor, levando a uma escolha entre duas opções ainda que a maioria não tenha estado nos dois locais e feito uma comparação individual) (Visscher, 2007; Mallon et al, 2011).

Com relação às estratégias para descarte e manejo do lixo, uma divisão de trabalho no manejo e descarte do lixo também foi descrita para *Acromyrmex echinator* (Waddington & Hughes, 2010). Hart e Ratnieks (2001) também observaram essa divisão de trabalho nos ninhos de *Atta cephalotes* e que as operárias trabalhando nesta tarefa dificilmente abandonam a função. Essa divisão de trabalho é reforçada por comportamentos agressivos em direção às lixeiras, talvez contaminadas por detritos e cadáveres, de forma a isolar potenciais ameaças ao jardim de fungo. Uma segregação das operárias de lixo também foi observada em *Atta sexdens rubropilosa*, mas o fator determinante parece não ser o contato imediato com o lixo, e sim o histórico prévio da operária,

ou seja, se ela era cortadora ou lixeira antes de uma situação em que ela teve contato com o lixo (Viegas et al., 2015). Essas medidas profiláticas foram descritas como uma "imunidade social" por Cremer et al. (2007).

A manutenção de condições adequadas de umidade para o ninho é outro problema que pode ser enfrentado por formigas quando confrontadas por fatores de desestabilização. Ribeiro e Navas (2008) investigaram o comportamento de *Atta sexdens rubropilosa* em resposta à desidratação experimental do fungo, mostrando especialização de tarefa, com a organização social ajudando na manutenção de condições microecológicas favoráveis ao ninho para a sobrevivência da colônia. Operárias de diversos tamanhos participaram da busca de água nas colônias desidratadas, mas foram predominantemente as formigas pequenas que, após a descoberta de fontes de água, coletaram o recurso. No que diz respeito ao mecanismo envolvido, parece mais provável que se trate de identificação das condições de umidade e do estado do fungo do que de sede individual, porque neste caso se esperaria que operárias grandes também coletassem água.

As formigas também apresentam mecanismos para solução de problemas quando se trata dos locais e das estratégias de forrageamento. Num estudo de Dussutour et al. (2009a) foi demonstrado que, na presença de uma restrição de altura colocada em uma ponte ligando o ninho até a área de forrageamento, algum tempo após o início do experimento, as forrageadoras de *Atta colombica*, independentemente de seu tamanho, cortavam pedaços menores e mais arredondados de folhas. O ajuste no tamanho ocorria na área de forrageamento e não no momento em que as formigas encontravam a restrição de altura no caminho de volta para a colônia. Este resultado sugere a existência de um modelo que as operárias armazenam e usam como referência, para ajustar o comportamento de forrageamento, e mostra que o corte dos fragmentos não é restrito pela morfologia das operárias.

Ribeiro et al (2009) mostraram que operárias de *Atta sexdens rubropilosa* aprendem a forragear em um sistema de tráfego unidirecional. Normalmente, as trilhas apresentam duas direções: uma de formigas indo do ninho até a área de forrageamento e outras voltando na direção oposta. No experimento

desenvolvido, a operária deixava a área do ninho através de uma ponte que descia até a bandeja de forrageamento, mas entre as duas havia um espaço, de forma que o único jeito de transpassá-lo era caindo ou se jogando. A mesma conformação estava presente na ponte saindo da área de forrageamento e voltando ao ninho. Vinte das 25 colônias testadas solucionaram o problema (que impedia a formação contínua de uma trilha química), porém foi constatado que, mesmo após 20 dias de experimento, algumas operárias ainda ficavam confusas, perdidas ou seguiam a direção errada.

Quando se trata da escolha do caminho mais curto entre duas opções até a fonte de alimento, um experimento de Beckers et al (1992) com *Lasius niger* mostrou a importância do *U-turn*. Eles demonstraram que um número significativo de forrageadoras que escolhia o ramo mais longo retornava (fazia o *U-turn*) antes de atingir seu final e escolhia o outro ramo (mais curto) ou voltava para o ninho. Os autores definem dois tipos de *U-turn*: o intrínseco e o baseado na trilha. O *U-turn* intrínseco é aquele que ocorre ao longo do ramo escolhido, e não no ponto de decisão; ele está relacionado com a ideia de que um caminho pode ser intrinsecamente não atrativo para um indivíduo e isto pode variar dependendo dos obstáculos no caminho, orientação, substrato e outros. O *U-turn* baseado na trilha é observado logo após o ponto de decisão, no momento em que o indivíduo detecta que desviou da trilha principal e volta atrás. Os autores observaram que a frequência do *U-turn* intrínseco diminui uma vez que a concentração da trilha aumenta, e pode servir para a seleção do caminho mais curto. O *U-turn* baseado na trilha está relacionado com a súbita queda na concentração da trilha não escolhida ao passar do caminho central, e sua frequência também diminui uma vez que a concentração na trilha escolhida aumenta.

Outros mecanismos também podem ser usados, em maior ou menor grau dependendo da espécie, especialmente no forrageamento, como a memória e as pistas visuais. Grüter et al (2011) observaram que, em *Lasius niger*, as rotas de memória são responsáveis por quase todas as escolhas corretas em uma bifurcação, na qual um dos lados a formiga já conhecia (havia “visitado”, ou seja, tinha memória prévia) e o outro era novidade e estava marcado com feromônio

de trilha. O sucesso na escolha por memória ocorreu apenas após 1-3 visitas à fonte de comida. A chance de sucesso também estava correlacionada positivamente com o número de viagens prévias: 74,6% das formigas escolheram corretamente após uma visita e 95,3% após três visitas. As trilhas de feromônios também tiveram um efeito mais fraco na escolha feita por formigas ingênuas, com apenas 61,6% e 70,2% escolhendo o ramo que havia sido marcado por uma ou por 20 forrageadoras versus um ramo sem marcação. A mesma correlação positiva não foi encontrada quando a concentração do feromônio de trilha foi aumentada ou diminuída; ela pareceu não ter influência na escolha entre memória e pista química. Uma relação semelhante foi encontrada em um estudo feito por Harrison et al (1989) com a formiga *Paraponera clavata* ("tocandira"), em que eles descobriram que formigas ingênuas escolhem mais vezes a trilha química, no entanto, as formigas que já tem experiência prévia em uma rota, ao serem confrontadas com os dois tipos de informação, escolhem preferencialmente a rota de memória, provavelmente com base em pistas visuais.

Em *Atta cephalotes* foi demonstrado que a estridulação funciona como um meio de comunicação semelhante ao feromônio de alarme, embora não atraia tantas operárias quanto a comunicação química. A estridulação funciona apenas quando a operária realizando tal comportamento está em contato com um substrato, gerando vibrações que são propagadas. Markl (1965) sugere que a estridulação serviria no contexto ecológico da espécie como um sinal de emergência para sinalizar operárias que ficaram presas em deslizamentos de terra e "pedir ajuda" durante a escavação do ninho, onde o alarme químico talvez não fosse tão eficiente. Recentemente, Miler (2016) afirmou que, de fato, esse pedido de ajuda não parece ser feito por vias químicas – pelo menos não pelas glândulas mandibulares.

Roces et al. (1993) reforçam que a estridulação é um tipo de estímulo mecânico envolvido na comunicação de formigas cortadeiras, presente em várias espécies. Eles defendem que a estridulação serviria não apenas para comunicação de sinais de estresse, e sugerem uma nova função para o comportamento: comunicação e recrutamento durante o forrageamento.

Operárias de *Atta cephalotes* estridulam quando estão cortando uma folha ou ao voltar para o ninho com sua carga. As operárias próximas respondem às vibrações produzidas e se orientam em direção à fonte de vibração e posteriormente se juntam à operária que encontrou o alimento. Por fim, também foi demonstrado nesse mesmo estudo que a intensidade da estridulação varia conforme a qualidade do alimento aumenta, servindo para orientar as operárias até recursos de alta qualidade. Roces e Hölldobler (1996) também demonstraram que a frequência de estridulação aumenta conforme o tempo de privação, apoiando a hipótese de que as formigas cortadeiras estridulam durante o corte das folhas para recrutar outras operárias e que se trata de uma comunicação mecânica para recrutamento. O órgão estridulatório especializado na produção de sons e vibrações, pode ser encontrado em diversas espécies de cinco subfamílias (Myrmicinae, Pseudomyrmecinae, Ponerinae, Ectatomminae e Nothomyrmecinae) (Markl, 1973). Recentemente, esse artigo foi revisado e atualizou os nomes genéricos das espécies, bem como as atuais classificações taxonômicas – sendo que agora as cinco subfamílias classificadas como Myrmicinae, Pseudomyrmecinae, Ponerinae, Ectatomminae e Paraponerinae, além de confirmar os dados que apontavam que o órgão estridulatório é mais prevalente em espécies epigeicas (Golden & Hill, 2016).

1.2 Sinais químicos

Também está descrita na literatura a associação da memória individual com as trilhas de feromônio. Num estudo de Czaczkes et al. (2011), foi demonstrado que formigas experientes, ou seja, que já conheciam previamente um determinado caminho, andavam 30% mais rápido por esse caminho se ele estivesse marcado com feromônio. Isto demonstra um efeito sinérgico entre as duas fontes de informação. Pedro Leite Ribeiro (comunicação pessoal) também concorda com a ideia de que ambos trabalham em conjunto, mas acrescenta que possivelmente o feromônio tenha um papel direcional e que a motivação para uma formiga seguir determinada trilha acontece por recrutamento, durante o contato antenal.

Sinais químicos são amplamente usados pelas formigas no reconhecimento intra e interespecífico. Em grande parte dos casos estudados em formigas até o

momento, a identificação das companheiras de ninho e dos estágios larvais é feita por contato das antenas. Este fato por si só sugere a existência de quimiorrecepção (Hölldobler & Wilson, 1990). Alguns trabalhos sugerem o envolvimento de hidrocarbonetos cuticulares (e.g., Vander Meer & Wojcik, 1982), ou seja, misturas complexas que podem incluir dezenas de compostos distintos, com comprimento de cadeia normalmente entre 21 e mais de 40 carbonos (Sturgis et al, 2012), como parte da identificação individual. Alguns trabalhos descrevem espécies que usam a identificação cuticular para identificar indivíduos que não estejam em sincronia reprodutiva com o restante do grupo e assim eliminá-los da colônia (Teseo et al., 2013; Delabie et al., 2015). A estrutura química dos hidrocarbonetos pode ser igual em algumas espécies, mas as quantidades relativas presentes na cutícula são diferentes de forma que elas sejam distinguíveis entre si (Nelson et al, 1980).

Os sinais químicos não são importantes apenas no reconhecimento. São também muito importantes para a tomada de decisão durante o forrageamento. Foi demonstrado que o odor, ou seja, a composição química do alimento, influencia na tomada de decisão do tipo de alimento a ser coletado. Roces (1994) realizou um experimento no qual uma operária de *Acromyrmex lundii* escolhe inicialmente entre dois tipos de alimento e, ao retornar ao ninho com uma amostra do alimento escolhido, a maioria das operárias que saía para forragear depois dela escolhia um pedaço de papel que tivesse o mesmo odor do alimento inicialmente trazido pela primeira operária. Isso ocorreu mesmo quando o alimento trazido apresentava um odor desagradável para elas, como o citral.

Outro uso dos sinais químicos acontece nas trilhas de forrageamento. Essas trilhas são extremamente importantes na comunicação e na geração de comportamentos coletivos. O mecanismo de marcação das trilhas foi descrito por Wilson (1962) como um processo de *feedback* positivo, no qual uma formiga encontra uma fonte de alimento e, ao retornar ao ninho, marca o caminho com feromônio. Ao retornar, a primeira formiga recruta outras, essas por sua vez seguem a trilha e, ao retornarem, repetem o mesmo processo de deposição de feromônio, reforçando-o.

Para várias espécies de formigas essa trilha química de feromônios já foi identificada (Ritter et al, 1977, Hölldobler et al, 2001, Plowes et al, 2013). Dentro da tribo *Attini*, o componente principal é o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (Riley et al, 1974; Cross et al, 1982). Para *Atta sexdens rubropilosa*, o mesmo componente foi identificado, mas diferentemente da maioria das espécies da tribo *Attini*, ele não é o componente principal, e sim o 3-etil-2,5-dimetilpirazina (Cross et al, 1979).

Em *Monomorium pharaonis*, o componente atrativo de trilha descrito foi o 5-Metil-3-Butil-Octaidroindolizina (Ritter et al., 1973).

Para algumas espécies é inclusive descrita uma composição química complexa, com frações voláteis e não voláteis como, por exemplo, em *Atta texana* (Moser & Blum, 1963). Essa composição química complexa foi abordada no estudo de Jackson et al. (2006), em que propõem a utilização de um sistema duplo de trilhas na formiga *Monomorium pharaonis*. Afirmam que a trilha depositada por essa espécie tem, além do componente rapidamente volátil e, portanto, de vida curta, um componente persistente (fração não volátil) que apresenta um papel diferente no forrageamento, e o estudo deles é o primeiro a quantificar a longevidade da trilha como uma função do tráfego na mesma. Também destacam uma especialização comportamental simples, mas extremamente importante, de algumas forrageadoras individuais: a posição de suas antenas. Observaram que apenas formigas que tocavam suas antenas no substrato obtinham sucesso na detecção da trilha de longa duração.

Esse mecanismo duplo de trilhas, uma de curta duração e uma de longa duração, foi posteriormente também verificado na espécie *Pheidole megacephala* (Dussutour et al, 2009b).

Uma vez que o mecanismo de deposição de feromônios numa trilha é caracterizado por um *feedback* positivo, ou seja, ele intensifica a si próprio, muitas vezes é difícil abandonar uma trilha já bem definida quando outra superior é descoberta. Existem alguns mecanismos que podem interromper ou modular esse *feedback* positivo por meio de um efeito negativo. Um deles é simplesmente a taxa de decaimento do feromônio que, por ser volátil, acaba se extinguindo após um tempo (Hölldobler & Wilson, 1990). A taxa de decaimento dos

feromônios depende do substrato no qual estão sendo depositados. Wilson (1962) demonstrou que em *Solenopsis saevissima* uma trilha artificial formada pela utilização do conteúdo glandular de uma única operária decai mais lentamente em papel mata-borrão (até 20 minutos) do que sobre vidro (3,5 – 7 minutos). Mais recentemente, Jeanson et al. (2003) também realizaram um experimento comparativo entre dois substratos com a formiga *Monomorium pharaonis* e calcularam que a meia-vida do feromônio (provavelmente o de curta duração) em papel e em plástico era de 3 minutos e 9 minutos, respectivamente.

Outro possível mecanismo é o de ou aglomeração¹, que pode aumentar a tendência de as formigas serem "empurradas" para uma via alternativa e, assim, encontrarem um novo caminho (Dussutour et al, 2006). Foi demonstrado que a aglomeração nas trilhas também causa uma redução no número de deposições de feromônio realizado por cada forrageadora, ao menos em parte pelo número de colisões com companheiras, avaliado pela presença dos hidrocarbonetos cuticulares e também pelo auxílio da cor escura (Czaczkes et al, 2013).

Um fato interessante é que apesar de possuírem um mecanismo para lidar com aglomeração, quando há escolha entre caminhos ainda sem aglomeração, as formigas escolhem preferencialmente o caminho que contém mais companheiras de ninho (Czaczkes et al, 2015), possivelmente por haver um benefício na transferência elevada de informações e potencial de recrutamento. A presença de companheiras de ninho, juntamente com a falta de feromônios de alarme, pode reafirmar que o caminho é seguro e produtivo.

Embora tenha sido descrito na literatura o uso de mais de um tipo de feromônio nas trilhas (Jackson et al, 2006, Dussutour et al, 2009b), Robinson et. al (2005) registram pela primeira vez o uso de um terceiro tipo de feromônio: o feromônio repelente ('No entry') para a marcação de caminhos não recompensados, na formiga *Monomorium pharaonis*. Esse feromônio seria depositado nas bifurcações, ou em "pontos de decisão", impedindo que as forrageadoras entrassem em caminhos que não levassem a alimento. Posteriormente, Robinson et al (2008a) demonstram que o efeito deste

¹ Em inglês, "crowding"

feromônio dura cerca de 78 minutos e que, aliado aos outros dois feromônios de marcação de trilha descritos para esta espécie – um de curta duração e outro de longa duração – teríamos um sistema de forrageamento onde cada um desempenharia um papel: o feromônio atrativo de longa duração seria depositado em todos os caminhos que levaram a uma fonte de alimento nos últimos dias e onde potencialmente pode novamente ser encontrado alimento; os outros dois feromônios de curta duração seriam depositados em parte dessas trilhas, o atrativo ao longo de todo o caminho até a fonte de alimento explorada naquele momento e o repelente depositado nas bifurcações, evitando que as formigas escolhessem o lado sem alimento. Apenas pelas taxas de decaimento dos feromônios essa conformação de trilhas poderia ser mudada, por exemplo, quando uma fonte de alimento explorada eventualmente se esgotasse e uma anterior precisasse ser novamente explorada.

A existência de um tipo repelente de feromônio nos mostra como o mecanismo de trilhas para forrageamento é mais sofisticado do que se pensava a princípio. Essa estratégia poderia ser um complemento aos feromônios atrativos de trilha ou poderia evitar um *feedback* fortemente positivo dos feromônios atrativos (Robinson et al, 2008b), impedindo assim que o sistema se fechasse em soluções não ideais.

A descrição do feromônio ‘No entry’ em *Monomorium pharonis* foi um estudo pioneiro e levantou a questão sobre possíveis mecanismos químicos de interrupção de um sinal positivo. Estudos posteriores em abelhas mencionam um ‘*sinal pare*’ que teria função semelhante (Kietzman & Visscher, 2016), porém seria uma variação da famosa dança das abelhas², ou seja, um sinal físico, não químico (Kietzman, Visscher & Lalor, 2017).

Mesmo só tendo sido descrito até o momento para uma única espécie de formiga, conforme constatado por Czaczkes, Tomer e Jürgen (2015), e segundo busca bibliográfica até o ano de 2017, alguns estudos sobre modelos matemáticos de forrageamento passaram a adotar o feromônio ‘No entry’ como parte de seus cálculos (Ramos, Rodrigues & Louçã, 2013; Jimenez-Romero,

2 Em inglês, *waggle dance*

Sousa-Rodrigues, Johnson, & Ramos, 2015), bem como um estudo comportamental dentro da própria espécie (Price, Grüter, Hughes & Evison, 2016), embora nesse caso a presença do feromônio 'No entry' seja mencionada apenas na introdução, mas não na discussão como possível mecanismo de feedback negativo para explicar os resultados dos autores sobre quebra de simetria em fontes de alimentos de diferentes qualidades.

É comum que descobertas inéditas no mundo científico gerem curiosidade e chamem a atenção dos pesquisadores e, portanto, também é comum que estudos posteriores a essas descobertas publicadas passem a adotá-las como verdades e como pontos de partida para suas argumentações.

No entanto, diante do que alguns pesquisadores chamam de “crise da replicação” (Loken & Gelman, 2017; Maxwell, Lau, & Howard, 2015; Schooler, 2014) e, devido à importância do tema levantado no artigo de Robinson et al. (2005), surgiu a questão sobre se poderíamos assumir como verdade absoluta a existência desse feromônio repelente. Até o momento, ele só foi descrito para uma única espécie e replicado por um único grupo de pesquisa, diferentemente dos feromônios de trilha positivos, já totalmente aceitos no meio científico por serem facilmente observados e testados para várias espécies de formigas.

2 Objetivos

Replicar o experimento 'No entry' em *Monomorium pharaonis* a fim de comprovar ou rejeitar sua existência.

Realizar experimentos adicionais para elucidar se o controle escolhido é, de fato, neutro, em relação a outros possíveis candidatos.

3 Hipóteses

1. Existe um feromônio 'No entry' em *Monomorium pharaonis* para impedir que as formigas escolham caminhos não recompensados.
2. As formigas, ao se aproximarem do braço com feromônio repelente, terão maior probabilidade de apresentar comportamento de meia volta (*U-turn*).
3. A marcação territorial, estímulo escolhido como controle, é a melhor opção entre as possíveis, pois representa um estímulo considerado neutro.

4 Materiais e Métodos

4.1 Sujeitos

Para o presente estudo, foram usadas seis colônias de formigas *Monomorium pharaonis* gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Odair Correa Bueno, do Centro de Estudos de Insetos Sociais da UNESP-Rio Claro, e que foram mantidas no Laboratório de Formigas Walter Hugo Cunha do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da USP. Cada colônia se localizava entre dois azulejos e todos os azulejos eram mantidos em uma única bandeja plástica. As colônias foram provisionadas diariamente com larvas de *Tenebrium molitor*, bem como pedaços de atum e mel, e água *ad libitum*.

As colônias foram mantidas em temperatura ambiente (24 ± 2 °C) e umidade controlada (60-10 UR%) em uma sala com janelas, estando assim sujeitas a ciclos de claro/escuro de aproximadamente 12 horas.

4.2 Aparato Experimental – Ponte de acrílico

Foram confeccionadas duas pontes de acrílico transparente idênticas. A ponte funciona ligando o local onde está localizado a colônia a dois béqueres de

vidro, sem conexão entre eles. Ao sair do ninho, a formiga deve subir 13 cm em um ângulo de 90° em relação à bandeja e depois mais 8 cm em uma linha reta, paralela à bandeja e 13 cm acima da colônia. Nesse ponto, encontrará uma bifurcação, de onde saem dois braços, um deles desviando para a direita e o outro para a esquerda, e, após 2,5 cm, esses dois braços voltam a ficar paralelos entre si, porém cada um dará acesso a um béquer diferente (Figuras 1 e 2). Foi aplicado flúon nas bordas da bandeja e dos béqueres, bem como nas partes de baixo das pontes.

Figura 1 – Ponte de acrílico usada nos experimentos com suas respectivas medidas

Fonte: Janiele P. Silva.

Figura 2 – Montagem usada no momento do experimento

Fonte: autora.

Cada colônia foi colocada na respectiva bandeja (já com a ponte) 48 horas antes dos experimentos, de forma que elas pudessem fazer marcações territoriais e explorar o novo ambiente. As formigas foram mantidas em privação de alimento durante esse período, porém era oferecida água *ad libitum*.

4.3 Limpeza do aparato

As pontes, bem como outros materiais usados, eram limpos entre cada uma das réplicas, para retirar todas as marcações químicas.

Os materiais eram lavados primeiramente com detergente comum de cozinha e depois era feita uma segunda lavagem com detergente Extran 0,2% e deixados secar naturalmente. Após a secagem era feita a limpeza com álcool etílico 95%.

4.4 Protocolo Experimental – No Entry

4.4.1 Parte I – Colônia A (Marcadora)

Na ponte conectada à colônia A foi colocada uma tampa de plástico contendo solução de água com açúcar a 0,1 M no interior do béquer e o outro braço foi mantido sem nada. Antes do início do experimento foram posicionados dois pedaços de papel – um na bifurcação direita e outro na bifurcação esquerda (Figura 3). Um pedaço de papel com dimensões idênticas foi colocado próximo à colônia 48 horas antes do experimento, longe das trilhas de forrageamento para água e comida, mas onde as formigas podiam marcá-las com feromônios territoriais (Controle). A primeira parte do experimento foi iniciada quando a solução foi colocada em um dos braços e o forrageamento ocorreu livremente por 30 minutos. Após esse período, o papel foi cuidadosamente retirado do braço sem recompensa ('No entry') e separado, bem como o papel controle.

Figura 3 - Papéis posicionados na bifurcação da ponte

Fonte: autora.

4.4.2 Parte II – Colônia B (Teste)

Na colônia teste foi colocada uma tampa de plástico contendo solução de água com açúcar a 0,1 M ao final dos dois braços antes de cada experimento. O forrageamento ocorreu livremente por 30 minutos, concomitantemente com o

forrageamento na colônia marcadora. Durante esse período foi contabilizado o fluxo nos dois braços. Após esse período, o alimento foi retirado de ambos os braços, juntamente com as formigas que estavam na ponte. Essas formigas foram “varridas” uma a uma para um pote vazio e de maneira rápida para que o procedimento não provocasse uma reação de alarme e consequente deposição de feromônios.

4.4.3 Parte III – Experimento na colônia Teste

No momento do experimento, os dois papéis vindos da colônia A (do braço sem recompensa e o controle) foram colocados em cada um dos braços, logo após a bifurcação. Foi permitido então que as formigas subissem novamente na ponte e foi observada a escolha de cada uma. Foi considerado que a formiga poderia fazer três tipos de escolha: 1) escolher o lado controle, após ter caminhado até a metade do papel correspondente 2) escolher o lado ‘No entry’, após ter caminhado até a metade do papel correspondente, ou 3) fazer *U-turn* e não escolher nenhum dos dois lados (ou seja, chegar até a bifurcação, porém girar o corpo 180° graus, dando as costas à bifurcação e virando a cabeça em direção ao ninho, num comportamento que indicaria retorno ao local de origem). As formigas que fizeram uma escolha foram imediatamente retiradas (“varridas”) do aparato, com a ajuda de um pincel de cerdas finas, para que não fizessem novas deposições de feromônios. Foi observada a escolha das primeiras 25 formigas. Depois disso, a ponte era momentaneamente desconectada da colônia, os papéis invertidos de posição, e então era permitido que mais 25 formigas subissem no aparato e fizessem uma escolha. O experimento foi filmado e posteriormente analisado. O comportamento das formigas na bifurcação também foi analisado. Além da escolha, também foi verificado se a formiga antenava apenas um dos lados ou os dois lados antes de tomar uma decisão.

Foram realizadas três réplicas deste experimento, com três colônias diferentes, e a análise das possíveis combinações de escolhas foi feita usando o fluxograma a seguir (Figura 4).

Figura 4 - Fluxograma de tomada de decisão

Fonte: autora.

4.5 Protocolo Experimental – Teste de Controles

Além das réplicas do experimento original ‘No entry’, também acrescentamos três testes, a fim de testar a resposta do controle usado (marcação territorial) em relação a outros três tipos de marcação: Marcação positiva de trilha, marcação branca e a própria marcação territorial. O objetivo foi verificar se a marcação territorial, escolhida como controle no experimento principal, é, de fato, um estímulo “neutro”, ou seja, não apresenta valência positiva ou negativa, o que poderia enviesar os dados do experimento principal.

O protocolo experimental e análise de escolha das formigas foi exatamente o mesmo usado no experimento ‘No entry’, mudando apenas os estímulos sendo comparados.

4.5.1 Controle I – Marcação territorial X Marcação positiva

Nessa réplica foi comparada a marcação territorial com a marcação positiva de trilha. A marcação positiva foi obtida utilizando o papel posicionado no braço que apresentava alimento, ou seja, onde há a marcação com feromônios de trilha sabidamente atrativos. A marcação territorial foi obtida da forma já descrita anteriormente. Os dois papéis foram posicionados na colônia teste e a tomada de decisão foi analisada com base no fluxograma da Figura 4. Foi observada a escolha das primeiras 25 formigas. Depois disso, a ponte era momentaneamente desconectada da colônia, os papéis invertidos de posição, e então era permitido que mais 25 formigas subissem no aparato e fizessem uma escolha.

4.5.2 Controle II – Marcação territorial X Marcação neutra

Nessa réplica foi comparada a marcação territorial com a marcação presumidamente neutra. A marcação neutra foi obtida utilizando um papel sem nenhuma marcação conhecida, ou seja, onde nenhum indivíduo havia passado anteriormente, daqui em diante denominado “papel branco”. Embora seja chamada de marcação neutra, assumimos que o papel branco tenha caráter levemente atrativo para os indivíduos de *Monomorium pharaonis*, devido à sua natureza altamente exploradora, ou seja, sua alta taxa de recrutamento de novos indivíduos para ambientes não explorados anteriormente (Fourcassie & Deneubourg, 1994). A

marcação territorial foi obtida da forma já descrita anteriormente. Os dois papéis foram posicionados na colônia teste e a tomada de decisão foi analisada com base no fluxograma da Figura 4. Foi observada a escolha das primeiras 25 formigas. Depois disso, a ponte era momentaneamente desconectada da colônia, os papéis invertidos de posição, e então era permitido que mais 25 formigas subissem no aparato e fizessem uma escolha.

4.5.3 Controle III – Marcação territorial X Marcação territorial

Nessa réplica foi comparada a marcação territorial com ela mesma. A marcação territorial foi obtida da forma já descrita anteriormente, com a única diferença que dois papeis eram posicionados na colônia teste e posteriormente posicionados lado a lado na própria colônia teste. A tomada de decisão foi analisada com base no fluxograma da Figura 4. Foi observada a escolha das primeiras 25 formigas. Depois disso, a ponte era momentaneamente desconectada da colônia, os papéis invertidos de posição, e então era permitido que mais 25 formigas subissem no aparato e fizessem uma escolha.

4.6 Análise estatística

Foram realizados testes qui-quadrado (X^2) usando o software SPSS® versão 20.0.

5 Resultados

5.1 Réplicas do experimento 'No entry'

Durante a primeira parte do experimento na colônia teste (comida colocada dos dois lados), o fluxo de formigas em cada um dos braços é mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Comparação do fluxo de formigas em cada braço na colônia teste durante a parte inicial do experimento (comida em ambos os lados)

Fonte: autora.

Embora a distribuição esperada seja de 50% para cada lado, um dos lados sempre acabou sendo mais escolhido nas três réplicas. Essa diferença foi maior na réplica 1, onde um lado foi quase quatro vezes mais frequentado que o outro, aproximadamente duas vezes maior na réplica 2 e quase igual à proporção esperada na réplica 3.

Já na segunda parte do experimento com a colônia teste, os comportamentos registrados foram divididos em duas grandes classificações: as formigas que antenaram os dois lados *versus* as que antenaram apenas um dos lados e as formigas que escolheram um lado *versus* as formigas que fizeram *U-turn*. Dentro do grupo das formigas que escolheram um dos lados, dividiu-se as que escolheram o lado que apresentava o papel controle *versus* as que escolheram o papel marcado com 'No entry'. Esses dados são apresentados nas Figuras 6, 7 e 8.

Figura 6 - Escolhas feitas pelas formigas da colônia teste na Réplica 1

Fonte: autora.

Figura 7 - Escolhas feitas pelas formigas da colônia teste na Réplica 2

Fonte: autora.

Figura 8 - Escolhas feitas pelas formigas da colônia teste na Réplica 3

Fonte: autora.

As decisões individuais de cada indivíduo, em ordem cronológica, estão registradas no Apêndice A.

A partir destes dados, uma primeira investigação foi feita avaliando os indivíduos que, ao chegar ao local de escolha, fizeram *U-turn* e retornaram ao ninho, não atingindo o ponto que a metodologia considerava ter havido escolha por um dos lados.

Quando distribuídos nas diferentes replicações e nos momentos pré e pós inversão dos papéis, temos a Tabela 1 a seguir. A primeira e terceira réplicas são bastante parecidas entre si, já na segunda houve alguma variação. A primeira diferença é que a proporção de *U-turn* parece ser menor na réplica 2 do que nas demais ($\chi^2 = 9,517$ e $p = 0,009$). A segunda é que, na réplica 2, existe uma diferença maior nas distribuições da frequência de *U-turn* pré e pós inversão que, contudo, não foi confirmada pelo teste ($\chi^2 = 2,318$ e $p = 0,247$).

Tabela 1 - Número total e porcentagem de indivíduos que escolheram um lado ou fizeram *U-turn* em cada réplica

Réplica	Pré/Pós inversão	Escolheu um lado		Fez <i>U-turn</i>	
		N	%	N	%
1	Pré	16	64	9	36
	Pós	13	52	12	48
	Total 1	29	58	21	42
2	Pré	23	92	2	8
	Pós	19	76	6	24
	Total 2	42	84	8	16
3	Pré	13	52	12	48
	Pós	17	68	8	32
	Total 3	30	60	20	40

Distribuindo o *U-turn* em função da antenação, podemos ver apenas uma proporção um pouco menor de *U-turn* nas formigas que antenaram somente o lado controle. Contudo, um teste qui-quadrado não mostrou uma associação entre antenação e escolha a 5% ($\chi^2=2,257$ e $p=0,332$) (Tabela 2).

Neste caso não foi possível realizar o teste com as repetições em separado devido à pequena frequência obtida em cada caso. No entanto, a tabela pode ser vista a seguir (Tabela 3) e, descritivamente, não parece haver associações entre as variáveis.

Tabela 2 - Associação entre lado antenado e a escolha feita pelo indivíduo

Antenou	Escolheu um lado		Fez U-turn	
	N	%	N	%
Os dois lados	83	66	42	34
No entry	7	58	5	42
Controle	11	85	2	15
Total	101	67	49	33

Tabela 3 - Associação entre lado antenado e a escolha feita pelo indivíduo separada por réplica

Réplica	Antenou	Escolheu um lado		Fez U-turn	
		N	%	N	%
1	Os dois lados	21	57	16	43
	No entry	4	57	3	43
	Controle	4	67	2	33
	Total	29	58	21	42
2	Os dois lados	35	81	8	19
	No entry	1	100	0	0
	Controle	6	100	0	0
	Total	42	84	8	16
3	Os dois lados	27	60	18	40
	No entry	2	50	2	50
	Controle	1	100	0	0
	Total	30	60	20	40

Uma vez observados os *U-turns*, agora foram considerados apenas os 101 indivíduos que fizeram escolhas por um dos caminhos (controle ou 'No entry'). No total, a distribuição foi bastante equilibrada, com 48 indivíduos escolhendo o lado 'No entry' e 53 o lado controle. Essa proporção não difere da proporção esperada de 50%-50%, segundo o teste qui-quadrado ($X^2=0,248$ e $p=0,619$).

A Tabela 4 mostra os totais das escolhas distribuídos em função da antenação.

Tabela 4 - Associação do total de escolhas em função do lado antenado

Antenou	No entry		Controle	
	N	%	N	%
Os dois lados	40	48	43	52
No entry	7	100	0	0
Controle	1	9	10	91
Total	48	48	53	53

Como pode ser observado, há diferenças nas proporções, que são confirmadas pelo teste qui-quadrado ($\chi^2=14,259$ e $p<0,001$). Aparentemente, o que ocorre é que a formiga escolhe o lado que foi antenado, quando antena um só, e há uma distribuição equivalente quando ela antena os dois lados. Assim, embora haja uma escolha diferente para cada comportamento, ela não parece ser função da existência de um controle ou “No entry”, apenas de qual foi o lado antenado.

Conforme pode ser observado na Figura 9, 100% das formigas escolheram o lado ‘No entry’ quando só antenaram ele e quase 100% escolheram o lado controle quando ele foi o único antenado. Quando os indivíduos antenaram os dois, a probabilidade parece ficar bem próxima a 50% para cada.

Figura 9 - Probabilidades estimadas de escolha em função do lado antenado

Fonte: autora.

Uma preocupação foi se o fluxo inicial das formigas no preparo do experimento poderia ter influenciado a escolha, devido ao fato da colônia estar utilizando mais um lado do que o outro, independentemente da manipulação experimental. Contudo, a distribuição das escolhas pré e pós inversão da marcação foi bastante semelhante, conforme pode ser observado na Tabela 5. Além disso, não parece haver associação entre a escolha por um lado e o momento pré ou pós-inversão ($\chi^2=2,191$ e $p=0,165$).

Tabela 5 - Distribuição de escolhas nos momentos pré e pós inversão

	Antenou	No entry		Controle	
		N	%	N	%
Pré-inversão	Os dois lados	18	44	23	56
	No entry	3	100	0	0
	Controle	0	0	8	100
	Total	21	40	31	60
Pós-inversão	Os dois lados	22	52	20	48
	No entry	4	100	0	0
	Controle	1	33	2	67
	Total	27	55	22	45

5.2 Réplicas do experimento controle

A Figura 10 mostra o fluxo de formigas em cada um dos braços durante a primeira parte do experimento na colônia teste (comida colocada dos dois lados).

Embora a distribuição esperada seja de 50% para cada lado, um dos lados sempre acabou sendo mais escolhido nas três réplicas. Essa diferença foi maior no controle 1, onde um lado foi quase quatro vezes mais frequentado que o outro, quase duas vezes maior no controle 2 e 1,5 vezes maior no controle 3.

Já na segunda parte do experimento com a colônia teste, os comportamentos registrados foram divididos em duas grandes classificações: as formigas que antenaram os dois lados *versus* as que antenaram apenas um dos lados e as formigas que escolheram um lado *versus* as formigas que fizeram *U-turn*. Dentro do grupo das formigas que escolheram um dos lados, dividiu-se as que escolheram o lado que apresentava o papel controle *versus* as que escolheram o papel marcado com controle positivo, controle neutro ou marcação territorial. Esses dados são apresentados nas Figuras 11 a 13.

Figura 10 - Comparação do fluxo de formigas em cada braço na colônia teste durante a parte inicial de cada controle (comida em ambos os lados) (Legenda: Controle 1 = Marcação positiva x Marcação territorial; Controle 2 = Marcação neutra x Marcação territorial; Controle 3 = Marcação territorial x Marcação territorial)

Fonte: autora.

Figura 11 - Escolhas feitas pelas formigas da colônia teste no Controle 1 (Marcação territorial x Marcação positiva)

Fonte: autora.

Figura 12 - Escolhas feitas pelas formigas da colônia teste no Controle 2 (Marcação territorial x Marcação neutra)

Fonte: autora.

Figura 13 - Escolhas feitas pelas formigas da colônia teste no Controle 3 (Marcação territorial x Marcação territorial)

Fonte: autora.

As decisões individuais de cada formiga, em ordem cronológica, estão registradas nas tabelas encontradas no Apêndice B.

A partir destes dados, foram feitas investigações para analisar a associação entre a antenação e as escolhas nos três controles testados.

Na Tabela 6 temos os dados dessa associação para o Controle 1 (Marcação territorial x Marcação positiva).

Tabela 6 - Associação entre antenação e escolha dos indivíduos no Controle 1

			Escolheu controle	Escolha Escolheu lado positivo	Fez <i>U-turn</i>	Total
Antenou	Os dois lados	N	0	23	8	31
		%	0	74	26	100
	Só o lado positivo	N	0	17	0	17
		%	0	100	0	100
	Só o controle	N	2	0	0	2
		%	100	0	0	100
Total		N	2	40	8	50
		%	4	80	16	100

Nesse teste, vemos que 40 indivíduos escolheram o lado positivo, somente 2 escolheram o controle e 8 fizeram *U-turn*. Embora somente este dado já chame a atenção, outro ponto importante mostrado pela tabela é: quem antenou os dois lados não escolheu o controle nenhuma vez, a maioria optou pelo lado positivo ou acabou fazendo *U-turn*. Somente aqueles indivíduos que antenaram apenas o lado controle optaram por ele, e vemos que isto aconteceu somente duas vezes ($\chi^2 = 55,484$, $gl=4$, $p<0,001$). Esses dados evidenciam um efeito do lado positivo em relação ao controle e também a associação da antenação e a escolha feita.

Na Tabela 7 a seguir vemos os resultados da investigação sobre a associação entre a antenação e a escolha dos indivíduos no Controle 2 (Marcação territorial x Marcação neutra).

Tabela 7 - Associação entre antenação e escolha dos indivíduos no Controle 2

			Neutro	Escolha Controle	<i>U-turn</i>	Total
Antenou	Os dois lados	N	4	12	5	21
		%	19	57,1	23,8	100
	Só o neutro	N	21	0	0	21
		%	100	0	0	100
	Só o controle	N	0	5	3	8
		%	0	62,5	37,5	100
Total		N	25	17	8	50
		%	50	34	16	100

Nesse teste, vemos que 25 indivíduos escolheram o lado neutro, 17 escolheram o controle e 8 fizeram *U-turn*. Logo, à primeira vista, parece haver uma preferência pelo lado neutro, já que metade dos indivíduos escolhe esse lado em relação às outras duas opções. No entanto, quando levamos em consideração o que ele antenou antes, vemos que destes 25 que escolheram o lado neutro, 21 deles antenaram somente este lado e apenas 4 antenaram os dois. Já dos que escolheram o controle, a maioria havia antenado os dois lados (12 indivíduos) e somente 5 havia antenado somente o controle. Segundo o teste, existe uma associação entre antenação e escolha ($\chi^2 = 37,355$, $gl=4$, $p<0,001$), portanto não fica claro se existe uma real diferença entre o controle e o papel neutro.

Por fim, na Tabela 8 a seguir vemos os resultados da investigação sobre a associação entre a antenação e a escolha dos indivíduos no Controle 3 (Marcação territorial x Marcação territorial). Para fins didáticos, chamaremos as marcações de A e B.

Tabela 8 - Associação entre antenação e escolha dos indivíduos no Controle 3

			Escolha			Total
			Escolheu A	Escolheu B	Fez <i>U-turn</i>	
Antenou	Os dois lados	N	5	27	6	38
		%	13	71	16	100
	Só o controle A	N	4	0	2	6
		%	67	0	33	100
	Só o controle B	N	0	6	0	6
		%	0	100	0	100
Total	N	9	33	8	50	
	%	18	66	16	100	

No geral, houve uma preferência por B, diferente do esperado, uma vez que as duas marcações territoriais foram feitas pela mesma colônia, de acordo com o mesmo protocolo experimental. No entanto, não houve só uma preferência na escolha pelo B, mas quem antenou os dois lados, também escolheu majoritariamente (71%) o B, e proporções semelhantes (13% e 16%) fizeram *U-turn* ou escolheram o lado A após antenar os dois lados. Também vemos que o número de formigas que antenou apenas um dos dois lados foi igual. No entanto, quem antenou só o B seguiu por ele em 100% dos casos. Quem antenou só o A fez *U-turn* ou escolheu esse lado, mas em nenhum

dos casos escolheu o B. Vale ressaltar que o N de indivíduos nesse caso foi baixo (6 indivíduos) ($\chi^2 = 16,715$, $gl=4$, $p=0,002$).

Em seguida, resolvemos investigar a influência da inversão na escolha. Conforme mostrado na Tabela 9, esse foi o único controle no qual, aparentemente, a escolha foi função da inversão, ou seja, o lado B continuou muito mais atraente do que o A. Isso nos leva à hipótese de uma possível contaminação experimental por fatores desconhecidos e, conseqüentemente, a dados enviesados ($\chi^2 = 2,384$, $gl=2$, $p=0,304$).

Tabela 9 - Associação entre escolha e os momentos pré e pós inversão no Controle 3

			Escolha			Total
			Escolheu A	Escolheu B	Fez <i>U-turn</i>	
Inversão	Pré	N	5	18	2	25
		%	20%	72%	8%	100%
	Pós	N	4	15	6	25
		%	16%	60%	24%	100%
Total		N	9	33	8	50
		%	18%	66%	16%	100%

6 Discussão

A importância dos feromônios na comunicação dos insetos sociais é inegável. Os feromônios são parte fundamental das suas estratégias de sobrevivência, principalmente no que diz respeito ao forrageamento, e por isso o estudo dessas marcações químicas é tão importante. Em particular, o feromônio ‘No entry’ chama a atenção porque ele é descrito como um mecanismo químico de feedback negativo e, até então, esses mecanismos de feedback só haviam sido descritos para o grupo das formigas como processos que não envolviam a deposição de novos sinais, como o crowding (Dussutour et al, 2006; Czaczkes et al, 2013; Czaczkes et al, 2015) ou simplesmente a taxa de decaimento do feromônio positivo de trilha (Hölldobler & Wilson, 1990).

Nossos resultados não foram tão conclusivos sobre a existência do ‘No entry’ como os obtidos por Robinson et. al (2005), cuja principal evidência em seu experimento foi a ocorrência de comportamentos de *U-turn* nas formigas que entravam em contato com o lado contendo o papel ‘No entry’ (frequência quatro vezes maior do que a esperada em relação ao controle) e pela alta proporção de formigas escolhendo o lado controle (71%). Nossos resultados foram semelhantes em relação ao total de formigas que fizeram *U-turn* (29% no experimento original e 32% no nosso), ainda que o número de colônias testadas por nós tenha sido menor (três versus quatro). No entanto, a proporção de formigas que escolheu o lado controle em nossos experimentos foi semelhante ao de formigas escolhendo o ‘No entry’ (52% versus 48%, no total das três réplicas), evidenciando uma distribuição aleatória entre as duas escolhas, ou seja, não há uma aparente repelência de um dos lados em relação ao outro.

A explicação mais parcimoniosa é de que não podemos afirmar que existe um feromônio repelente em *Monomorium pharaonis* em nosso estudo. No entanto, algumas hipóteses alternativas devem ser levadas em consideração.

A primeira delas é que, embora a metodologia e o aparato para realização do experimento tenham sido fieis ao experimento original, podem existir diferenças no ambiente ou mesmo nos indivíduos ou seu modo de criação que são alheios a todos os fatores que foram controlados.

Uma segunda hipótese é que, no experimento original, foi utilizado um tipo de papel que não fica bem especificado na metodologia, apenas é dito que se trata de papel ECF, ou seja, um papel que sofreu processo de branqueamento sem cloro. Em nosso experimento usamos papel vegetal (*tracing paper*). É possível que o papel vegetal tenha características diferentes do utilizado no experimento original, sendo susceptível às marcações químicas da primeira fase, localizadas no labirinto, e as tornando mais evidentes. Se levarmos em conta que feromônios de trilhas são voláteis (Hölldobler e Wilson, 1990) e assumirmos que, por exemplo, nosso papel foi mais poroso que o original, é possível que os feromônios positivos de trilha tenham sido atrativos o suficiente para que a formiga ultrapassasse o trecho que consideramos repelente e continuasse seguindo a marcação. Como na parte I do experimento ambos os caminhos levam a alimento e, conseqüentemente, são marcados com feromônios positivos, é possível que esses feromônios localizados em pontos posteriores ao do papel com 'No entry' tenham sido detectados pelas formigas de antemão, e elas optassem por ignorar a informação contraditória no meio do caminho.

É descrito na literatura (Jackson et. al, 2006) que a posição das antenas (levantadas, em contato com o substrato ou alternando entre as duas posições) influencia no sucesso de detecção do feromônio de trilha, sendo a posição em contato com o substrato a que tem maior taxa de sucesso. Durante a análise dos vídeos, para determinar se uma formiga antenou os dois lados ou não, observamos o toque das antenas em cima do papel, ou seja, em ao menos algum momento, todas elas tocaram o substrato. No entanto, não verificamos quantas vezes cada uma teve esse comportamento antes de fazer uma escolha ou se esse fato específico poderia ter alguma relação com a escolha. No experimento original não há uma descrição detalhada sobre as antenações, seja frequência ou posição das antenas, apenas é dito que "*Uturns were more than four times as likely if the ant had contacted the unrewarding-branch substrate (55%) as opposed to the neutral-control substrate (13%)*" (Robinson et. al, 2005, página 442). No entanto, como vimos nos nossos resultados, a antenação parece ter influência na escolha da formiga, já que formigas que antenam apenas um dos lados tem uma probabilidade muito maior de escolhê-lo (em comparação à proporção próxima de 50%-50% observada nas formigas que

antennaram os dois lados). Acreditamos que mais estudos são necessários para elucidar melhor o papel da antenação na tomada de decisão.

Com relação aos controles, fica evidente que a marcação de trilha tem um alto efeito atrativo em relação à marcação territorial. Por esse motivo, de fato, ela não pode ser usada como controle neutro nesse caso. No caso do papel branco, diferentemente do esperado, nosso estudo não encontrou diferenças comportamentais das formigas entre esse estímulo e a marcação territorial. Formigas consideradas pragas urbanas, como *Monomorium pharaonis*, têm grande capacidade de adaptação a novos ambientes e alto sucesso reprodutivo (Wetterer, 2010), em parte pela alta capacidade de exploração e recrutamento (Sudd, 1960; Camazine, 2003). Por esse motivo, esperávamos que um papel sem nenhuma marcação prévia fosse um estímulo positivo a elas, já que desencadearia o comportamento exploratório e de recrutamento. Essa hipótese também foi levantada no experimento original, no entanto, encontramos que se trata de um estímulo com valência semelhante ao do papel com marcação de trilha, não sendo possível determinar qual seria essa valência (positiva ou neutra). Nesse caso estudos mais completos seriam necessários para investigar a fundo a valência do controle e, se for o caso, sugerir controles mais adequados e os mais neutros possíveis.

Como acontece sempre que temos uma nova descoberta, muitas perguntas acabam sendo levantadas a partir da observação inicial e são necessários mais estudos para responder as questões em aberto e também para confirmar as observações já feitas. Como o feromônio 'No entry' é uma descoberta relativamente recente (Robinson et. al, 2005) em relação à descoberta do feromônio de trilha (Wilson, 1962), é comum que tenhamos poucos estudos adicionais a seu respeito (Robinson et al, 2008a) e também que eles sejam feitos pelo grupo que já trabalha com a linha de pesquisa em questão.

Embora os resultados encontrados não estejam totalmente de acordo com os originais (Robinson et. al, 2005), nosso trabalho chama a atenção para a importância da replicação, seja como forma de corroborar os dados, contestá-los ou sugerir melhorias. Dessa forma, a futura utilização teórica e prática, por exemplo, do 'No entry' em modelos matemáticos, como feito nos trabalhos de Ramos, Rodrigues & Louçã (2013) e Jimenez-Romero, Sousa-Rodrigues, Johnson, & Ramos (2015), seria mais

precisa e confiável. Seguindo essa linha de raciocínio, a ideia inicial deste trabalho era generalizar a existência do ‘No entry’ para *Atta sexdens rubropilosa* e, por esse motivo, fizemos experimentos tentando comprovar sua existência antes de decidir que seria melhor “dar um passo atrás” e replicar o experimento em *Monomorium pharaonis*. No Apêndice C apresentamos o resultado do piloto da réplica adaptada para *Atta sexdens rubropilosa*, cujos resultados iniciais também apontavam para a não existência do ‘No entry’.

No meio científico, para que todos possam partilhar as descobertas e dar continuidade aos estudos com base no que já foi previamente descrito, é importante que os experimentos sejam replicáveis por qualquer pessoa, em qualquer lugar. Para isso, é comum que sejam criados protocolos, diretrizes, questionários, entre outros, de uso geral, e que são validados. Essa prática é especialmente comum em áreas como medicina (e.g., Jones, 2002) e psicologia (e.g., Meyer, Miller, Metzger e Borkovec, 1990).

Também dentro do contexto médico, são amplamente utilizados os recursos da metanálise (e.g. DerSimonian e Laird, 1986), que consiste em analisar os resultados de dois ou mais estudos independentes, combinando seus resultados. Esse recurso é extremamente útil para se diminuir o erro sistemático, ou seja, a chance de resultados falso-positivos.

Observamos então que, seja para diminuir o erro estatístico ou para padronizar o que está sendo estudado, são necessárias réplicas. Como mencionado acima, essa prática é mais comum em estudos com humanos, inclusive em estudos comportamentais, mas parece menos difundida quando se trata de comportamento animal não humano (Kelly, 2006), pois encontramos poucas referências sobre o assunto.

Schooler (2014) cita em seu trabalho que todas as áreas do conhecimento enfrentam problemas com a reprodutibilidade, ou seja, os resultados considerados “falhas de replicação” são comuns, mas que muitas vezes essa falha em alcançar o mesmo resultado é considerada uma afronta ao pesquisador pioneiro, e não como uma oportunidade de analisar as possíveis falhas de um protocolo e sugerir melhorias a ele. Ele também afirma que a necessidade de réplicas de um experimento por outros grupos de pesquisa não deve ser encarada como uma possível fragilidade do campo

e elogia a psicologia enquanto campo pioneiro no esforço de larga escala para replicar seus experimentos.

Concluimos esse trabalho convictos de que estudos de replicação são extremamente valiosos para a ciência e não devem ser encarados com frustração quando os resultados não são os esperados e nem como meio de desafiar os resultados obtidos pelos outros. Seu valor está justamente em levantar hipóteses que expliquem o porquê de dados discrepantes e, a partir dessas hipóteses, sugerir melhorias. Convidamos todos os etólogos e estudiosos do comportamento a debruçar sobre a questão da replicação de experimentos e também a permitir e incentivar a replicação por outros grupos, sempre buscando resultados mais robustos e que sirvam para o avanço da ciência.

REFERÊNCIAS

- Beckers, R., Deneubourg, J. L., & Goss, S. (1992). Trails and U-turns in the selection of a path by the ant *Lasius niger*. *Journal of theoretical biology*, 159(4), 397-415.
- Beshers, S. N., & Fewell, J. H. (2001). Models of division of labor in social insects. *Annual review of entomology*, 46(1), 413-440.
- Bonabeau, E., Theraulaz, G., Deneubourg, J. L., Aron, S., & Camazine, S. (1997). Self-organization in social insects. *Trends in Ecology & Evolution*, 12(5), 188-193.
- Camazine, S. (2003). *Self-organization in biological systems*. Princeton University Press.
- Constantino, P.B., Ribeiro, P. L., Helen, A. F. Encontro Anual de Etologia, XXXIV, 2016, Jaboticabal. Fidelidade de formigas cortadeiras de mesma casta às tarefas de forrageamento e exploração (Anais eletrônicos). Jaboticabal / Editores: Aline Cristina Sant'Anna ... [et al.], 2016. Disponível em: <<http://www.etologiabrasil.org.br/media/upload/eae/anais-2016.pdf>>. Acesso em: 11 Mai 2017.)
- Couzin, I. D. (2009). Collective cognition in animal groups. *Trends in cognitive sciences*, 13(1), 36-43.
- Cremer, S., Armitage, S. A., & Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Current biology*, 17(16), R693-R702.
- Cross, J. H., Byler, R. C., Ravid, U., Silverstein, R. M., Robinson, S. W., Baker, P. M., Oliveira, J. S., Jutsum, A. R. & Cherrett, J. M. (1979). The major component of the trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa* Forel. *Journal of Chemical Ecology*, 5(2), 187-203.
- Cross, J. H., West, J. R., Silverstein, R. M., Jutsum, A. R., & Cherrett, J. M. (1982). Trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Acromyrmex octospinosus* (Reich), (Formicidae: Myrmicinae). *Journal of chemical ecology*, 8(8), 1119-1124.
- Czaczkes, T. J., Grüter, C., Jones, S. M., & Ratnieks, F. L. (2011). Synergy between social and private information increases foraging efficiency in ants. *Biology letters*, 7(4), 521-524.
- Czaczkes, T. J., Grüter, C., & Ratnieks, F. L. (2013). Negative feedback in ants: crowding results in less trail pheromone deposition. *Journal of The Royal Society Interface*, 10(81), 20121009.
- Czaczkes, T. J., Franz, S., Witte, V., & Heinze, J. (2015). Perception of collective path use affects path selection in ants. *Animal Behaviour*, 99, 15-24.

- Czaczkes, T. J., & Heinze, J. (2015, July). Ants adjust their pheromone deposition to a changing environment and their probability of making errors. In *Proc. R. Soc. B* (Vol. 282, No. 1810, p. 20150679). The Royal Society.
- Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*. Londres, Reino Unido: John Murray.
- Delabie, J. H. C., Feitosa, R. M., Serrão, J. E., Mariano, C. S. F., & Majer, J. D. (2015). As formigas poneromorfas do Brasil. *Ilhéus: Editus*.
- Detrain, C., & Deneubourg, J. L. (2008). Collective decision-making and foraging patterns in ants and honeybees. *Advances in insect physiology*, 35, 123-173.
- Dussutour, A., Nicolis, S. C., Deneubourg, J. L., & Fourcassié, V. (2006). Collective decisions in ants when foraging under crowded conditions. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(1), 17-30.
- Dussutour, A., Deneubourg, J. L., Beshers, S., & Fourcassié, V. (2009a). Individual and collective problem-solving in a foraging context in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Animal cognition*, 12(1), 21-30.
- Dussutour, A., Nicolis, S. C., Shephard, G., Beekman, M., & Sumpter, D. J. (2009b). The role of multiple pheromones in food recruitment by ants. *The Journal of experimental biology*, 212(15), 2337-2348.
- Fourcassie, V., & Deneubourg, J. L. (1994). The dynamics of collective exploration and trail-formation in *Monomorium pharaonis*: experiments and model. *Physiological Entomology*, 19(4), 291-300.
- Golden, T. M. J., & Hill, P. S. M. (2016). The evolution of stridulatory communication in ants, revisited. *Insectes Sociaux*, 63(2), 309-319.
- Grüter, C., Czaczkes, T. J., & Ratnieks, F. L. (2011). Decision making in ant foragers (*Lasius niger*) facing conflicting private and social information. *Behavioral ecology and sociobiology*, 65(2), 141-148.
- Hamilton, W. D. (1964). The genetical evolution of social behaviour. II. *Journal of theoretical biology*, 7(1), 17-52.
- Harrison, J. F., Fewell, J. H., Stiller, T. M., & Breed, M. D. (1989). Effects of experience on use of orientation cues in the giant tropical ant. *Animal behaviour*, 37, 869-871.
- Hart, A. G., & Ratnieks, F. L. (2001). Task partitioning, division of labour and nest compartmentalisation collectively isolate hazardous waste in the leafcutting ant *Atta cephalotes*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49(5), 387-392.
- Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (1990). *The Ants*. Cambridge, MA: Belknap Press of Harvard University Press.

- Hölldobler, B., Morgan, E. D., Oldham, N. J., & Liebig, J. (2001). Recruitment pheromone in the harvester ant genus *Pogonomyrmex*. *Journal of Insect Physiology*, 47(4), 369-374.
- Jackson, D. E., Martin, S. J., Holcombe, M., & Ratnieks, F. L. (2006). Longevity and detection of persistent foraging trails in Pharaoh's ants, *Monomorium pharaonis* (L.). *Animal Behaviour*, 71(2), 351-359.
- Jeanson, R., Ratnieks, F. L., & Deneubourg, J. L. (2003). Pheromone trail decay rates on different substrates in the Pharaoh's ant, *Monomorium pharaonis*. *Physiological Entomology*, 28(3), 192-198.
- Jimenez-Romero, C., Sousa-Rodrigues, D., Johnson, J. H., & Ramos, V. (2015). A model for foraging ants, controlled by spiking neural networks and double pheromones. *arXiv preprint arXiv:1507.08467*.
- Kelly, C. D. (2006). Replicating empirical research in behavioral ecology: how and why it should be done but rarely ever is. *The Quarterly Review of Biology*, 81(3), 221-236.
- Kietzman, P. M., & Visscher, P. K. (2016). The anti-waggle dance: use of the stop signal as negative feedback. *Ballroom Biology: Recent Insights into Honey Bee Waggle Dance Communications*, 54.
- Kietzman, P. M., Visscher, P. K., & Lalor, J. K. (2017). Stop signaling by foragers not encountering danger at a food source. *Insectes Sociaux*, 64(2), 307-309.
- Loken, E., & Gelman, A. (2017). Measurement error and the replication crisis. *Science*, 355(6325), 584-585.
- Mallon, E., Pratt, S., & Franks, N. (2001). Individual and collective decision-making during nest site selection by the ant *Leptothorax albipennis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 50(4), 352-359.
- Markl, H. (1965). Stridulation in leaf-cutting ants. *Science*, 149(3690), 1392-1393.
- Markl, H. (1973, September). The evolution of stridulatory communication in ants. In *Proceedings of the International Congress IUSSI, London* (Vol. 7, pp. 258-265).
- Maxwell, S. E., Lau, M. Y., & Howard, G. S. (2015). Is psychology suffering from a replication crisis? What does "failure to replicate" really mean?. *American Psychologist*, 70(6), 487.
- Miler, K. (2016). Moribund ants do not call for help. *PloS one*, 11(3), e0151925.
- Moser, J. C., & Blum, M. S. (1963). Trail marking substance of the Texas leaf-cutting ant: source and potency. *Science*, 140(3572), 1228-1228.

- Nelson, D. R., Fatland, C. L., Howard, R. W., McDaniel, C. A., & Blomquist, G. J. (1980). Re-analysis of the cuticular methylalkanes of *Solenopsis invicta* and *S. richteri*. *Insect Biochemistry*, 10(4), 409-418.
- Plowes, N. J., Colella, T., Johnson, R. A., & Hölldobler, B. (2013). Chemical communication during foraging in the harvesting ants *Messor pergandei* and *Messor andrei*. *Journal of Comparative Physiology A*, 1-9.
- Price, R. A., Grüter, C., Hughes, W. H., & Evison, S. E. F. (2016). Symmetry breaking in mass-recruiting ants: extent of foraging biases depends on resource quality. *Behavioral ecology and sociobiology*, 70(11), 1813-1820.
- Ramos, V., Rodrigues, D. M., & Louçã, J. (2013, September). Second order swarm intelligence. In *International Conference on Hybrid Artificial Intelligence Systems* (pp. 411-420). Springer Berlin Heidelberg.
- Ribeiro, P. L., & Navas, C. A. (2008). Colony dehydration and water collection by specialized caste in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Journal of insect behavior*, 21(6), 549-558.
- Ribeiro, P. L., Helene, A. F., Xavier, G., Navas, C., & Ribeiro, F. L. (2009). Ants can learn to forage on one-way trails. *PloS one*, 4(4), e5024.
- Riley, R. G., Silverstein, R. M., Carroll, B., & Carroll, R. (1974). Methyl 4-methylpyrrole-2-carboxylate: A volatile trail pheromone from the leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. *Journal of insect physiology*, 20(4), 651-654.
- Ritter, F. J., Rotgans, I. E. M., Talman, E., Verwiel, P. E. J., & Stein, F. (1973). 5-methyl-3-butyl-octahydroindolizine, a novel type of pheromone attractive to Pharaoh's ants (*Monomorium pharaonis* (L.)). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 29(5), 530-531.
- Ritter, F. J., Brüggemann-Rotgans, I. E. M., Verwiel, P. E. J., Persoons C. J., & Talman, E. (1977). Trail pheromone of the Pharaoh's ant, *Monomorium pharaonis*: isolation and identification of faranal, a terpenoid related to juvenile hormone II. *Tetrahedron Letters*, 18(30), 2617-2618.
- Robinson, G. E. (1992). Regulation of division of labor in insect societies. *Annual review of entomology*, 37(1), 637-665.
- Robinson, E. J., Jackson, D. E., Holcombe, M., & Ratnieks, F. L. (2005). Insect communication: 'No entry' signal in ant foraging. *Nature*, 438(7067), 442-442.
- Robinson, E. J. H., Green, K. E., Jenner, E. A., Holcombe, M., & Ratnieks, F. L. W. (2008a). Decay rates of attractive and repellent pheromones in an ant foraging trail network. *Insectes sociaux*, 55(3), 246-251.
- Robinson, E. J., Ratnieks, F. L., & Holcombe, M. (2008b). An agent-based model to investigate the roles of attractive and repellent pheromones in ant decision making during foraging. *Journal of Theoretical Biology*, 255(2), 250-258.

- Roces, F., Tautz, J., & Hölldobler, B. (1993). Stridulation in leaf-cutting ants. *Naturwissenschaften*, 80(11), 521-524.
- Roces, F. (1994). Odour learning and decision-making during food collection in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundi*. *Insectes sociaux*, 41(3), 235-239.
- Roces, F., & Hölldobler, B. (1996). Use of stridulation in foraging leaf-cutting ants: mechanical support during cutting or short-range recruitment signal?. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 39(5), 293-299.
- Roces, F. (2002). Individual complexity and self-organization in foraging by leaf-cutting ants. *The Biological Bulletin*, 202(3), 306-313.
- Schooler, J. W. (2014). Metascience could rescue the 'replication crisis'. *Nature*, 515(7525), 9.
- Teseo, S., Kronauer, D. J., Jaisson, P., & Châline, N. (2013). Enforcement of reproductive synchrony via policing in a clonal ant. *Current Biology*, 23(4), 328-332.
- Vander Meer, R. K., & Wojcik, D. P. (1982). Chemical mimicry in the myrmecophilous beetle *Myrmecaphodius excavaticollis*. *Science*, 218(4574), 806-808.
- Viegas, L. M.; Troitino, L. C., Pereira, K. J., Otta, E., Châline, N. Social Immunity and Waste Management In Colonies of *Atta sexdens rubropilosa*: Factors associated With Potential Threat Containment. In: SIMPÓSIO DE MIRMECOLOGIA, XXII, 2015, Ilhéus. **Anais** Ilhéus: USP, 2015. p. 16-29.
- Visscher, P. K. (2007). Group decision making in nest-site selection among social insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 255-275.
- Waddington, S. J., & Hughes, W. O. (2010). Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator*: the role of worker size, age and plasticity. *Behavioral ecology and sociobiology*, 64(8), 1219-1228.
- Wilson, E. O. (1962). Chemical communication among workers of the fire ant *Solenopsis saevissima* (Fr. Smith) 1. The Organization of Mass-Foraging. *Animal behaviour*, 10(1), 134-147.
- Wilson, E. O. (1971). The insect societies. Cambridge, MA: Belknap Press of Harvard University Press.
- Wilson, E. O. (1980). Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 7(2), 157-165.
- Wystrach, A., Schwarz, S., Baniel, A., & Cheng, K. (2013). Backtracking behavior in lost ants: an additional strategy in their navigational toolkit. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280 (1769).

APÊNDICE A

Decisões individuais de cada indivíduo de *Monomorium pharaonis* de acordo com a réplica antes e após a inversão e em ordem cronológica,

Continua

<u>Indivíduo</u>	<u>Primeira decisão</u>	<u>Segunda decisão</u>	<u>Lado com maior fluxo na etapa anterior</u>	<u>Réplica/Momento</u>
F1	Antenou só controle	Fez U-turn	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F2	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F3	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F4	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F5	Antenou só no entry	Fez U-turn	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F6	Antenou só no entry	Fez U-turn	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F7	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F8	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F9	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F10	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F11	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F12	Antenou só no entry	Escolheu no entry	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F13	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F14	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F15	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F16	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F17	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F18	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F19	Antenou só controle	Fez U-turn	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão

Continuação

<u>Indivíduo</u>	<u>Primeira decisão</u>	<u>Segunda decisão</u>	<u>Lado com maior fluxo na etapa anterior</u>	<u>Réplica/Momento</u>
F20	Antenou só controle	Escolheu controle	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F21	Antenou só no entry	Escolheu no entry	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F22	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F23	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F24	Antenou só controle	Escolheu controle	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F25	Antenou só no entry	Escolheu no entry	Controle	Réplica 1 - Antes da inversão
F26	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F27	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F28	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F29	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F30	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F31	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F32	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F33	Antenou só controle	Escolheu controle	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F34	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F35	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F36	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F37	Antenou só controle	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F38	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F39	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F40	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F41	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão

Continuação

<u>Indivíduo</u>	<u>Primeira decisão</u>	<u>Segunda decisão</u>	<u>Lado com maior fluxo na etapa anterior</u>	<u>Réplica/Momento</u>
F42	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F43	Antenou só no entry	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F44	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F45	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F46	Antenou só no entry	Fez U-turn	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F47	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F48	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F49	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F50	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 1 - Após a inversão
F51	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F52	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F53	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F54	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F55	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F56	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F57	Antenou só controle	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F58	Antenou só controle	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F59	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F60	Antenou só controle	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F61	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F62	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F63	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão

Continuação

<u>Indivíduo</u>	<u>Primeira decisão</u>	<u>Segunda decisão</u>	<u>Lado com maior fluxo na etapa anterior</u>	<u>Réplica/Momento</u>
F64	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F65	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F66	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F67	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F68	Antenou só controle	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F69	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F70	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F71	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F72	Antenou só controle	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F73	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F74	Antenou só controle	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F75	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 2 - Antes da inversão
F76	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F77	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F78	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F79	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F80	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F81	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F82	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F83	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F84	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F85	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 2 - Após a inversão

Continuação

<u>Indivíduo</u>	<u>Primeira decisão</u>	<u>Segunda decisão</u>	<u>Lado com maior fluxo na etapa anterior</u>	<u>Réplica/Momento</u>
F86	Antenou só no entry	Escolheu no entry	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F87	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F88	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F89	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F90	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F91	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F92	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F93	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F94	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F95	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F96	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F97	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F98	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F99	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F100	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 2 - Após a inversão
F101	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F102	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F103	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F104	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F105	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F106	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F107	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão

Continuação

<u>Indivíduo</u>	<u>Primeira decisão</u>	<u>Segunda decisão</u>	<u>Lado com maior fluxo na etapa anterior</u>	<u>Réplica/Momento</u>
F108	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F109	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F110	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F111	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F112	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F113	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F114	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F115	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F116	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F117	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F118	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F119	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F120	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F121	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F122	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F123	Antenou os 2	Escolheu no entry	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F124	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F125	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Réplica 3 - Antes da inversão
F126	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F127	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F128	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F129	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão

Continuação

<u>Indivíduo</u>	<u>Primeira decisão</u>	<u>Segunda decisão</u>	<u>Lado com maior fluxo na etapa anterior</u>	<u>Réplica/Momento</u>
F130	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F131	Antenou só no entry	Fez U-turn	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F132	Antenou só controle	Escolheu controle	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F133	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F134	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F135	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F136	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F137	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F138	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F139	Antenou só no entry	Fez U-turn	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F140	Antenou só no entry	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F141	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F142	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F143	Antenou os 2	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F144	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F145	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F146	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F147	Antenou só no entry	Escolheu no entry	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F148	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F149	Antenou os 2	Escolheu controle	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão
F150	Antenou os 2	Fez U-turn	No Entry	Réplica 3 - Após a inversão

APÊNDICE B

Decisões individuais de cada indivíduo de *Monomorium pharaonis* de acordo com o controle utilizado, antes e após a inversão e em ordem cronológica.

Continua

<u>Indivíduo</u>	<u>Primeira decisão</u>	<u>Segunda decisão</u>	<u>Lado com maior fluxo na etapa anterior</u>	<u>Réplica/Momento</u>
F1	Antenou só o +	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F2	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F3	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F4	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F5	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F6	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F7	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F8	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F9	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F10	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F11	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F12	Antenou só controle	Escolheu controle	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F13	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F14	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F15	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F16	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F17	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F18	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão

Continuação

<u>Indivíduo</u>	<u>Primeira decisão</u>	<u>Segunda decisão</u>	<u>Lado com maior fluxo na etapa anterior</u>	<u>Réplica/Momento</u>
F19	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F20	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F21	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F22	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F23	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F24	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F25	Antenou os 2	Escolheu o +	Controle	Controle 1 - Antes da inversão
F26	Antenou os 2	Fez U-turn	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F27	Antenou os 2	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F28	Antenou os 2	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F29	Antenou os 2	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F30	Antenou os 2	Fez U-turn	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F31	Antenou os 2	Fez U-turn	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F32	Antenou os 2	Fez U-turn	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F33	Antenou os 2	Fez U-turn	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F34	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F35	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F36	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F37	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F38	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F39	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F40	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão

Continuação

<u>Indivíduo</u>	<u>Primeira decisão</u>	<u>Segunda decisão</u>	<u>Lado com maior fluxo na etapa anterior</u>	<u>Réplica/Momento</u>
F41	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F42	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F43	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F44	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F45	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F46	Antenou só controle	Escolheu controle	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F47	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F48	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F49	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F50	Antenou só +	Escolheu +	Positivo	Controle 1 - Após a inversão
F51	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F52	Antenou só controle	Escolheu controle	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F53	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F54	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F55	Antenou os 2	Escolheu controle	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F56	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F57	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F58	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F59	Antenou só controle	Escolheu controle	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F60	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F61	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F62	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão

Continuação

<u>Indivíduo</u>	<u>Primeira decisão</u>	<u>Segunda decisão</u>	<u>Lado com maior fluxo na etapa anterior</u>	<u>Réplica/Momento</u>
F63	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F64	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F65	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F66	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F67	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F68	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F69	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F70	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F71	Antenou os 2	Escolheu controle	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F72	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F73	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F74	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F75	Antenou só branco	Escolheu branco	Neutro	Controle 2 - Antes da inversão
F76	Antenou só controle	Escolheu controle	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F77	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F78	Antenou só controle	Fez U-turn	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F79	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F80	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F81	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F82	Antenou só controle	Escolheu controle	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F83	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F84	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Controle 2 - Após a inversão

Continuação

<u>Indivíduo</u>	<u>Primeira decisão</u>	<u>Segunda decisão</u>	<u>Lado com maior fluxo na etapa anterior</u>	<u>Réplica/Momento</u>
F85	Antenou os 2	Escolheu branco	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F86	Antenou os 2	Escolheu branco	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F87	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F88	Antenou só controle	Escolheu controle	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F89	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F90	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F91	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F92	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F93	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F94	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F95	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F96	Antenou os 2	Escolheu controle	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F97	Antenou os 2	Escolheu branco	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F98	Antenou os 2	Escolheu branco	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F99	Antenou só controle	Fez U-turn	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F100	Antenou só controle	Fez U-turn	Controle	Controle 2 - Após a inversão
F101	Antenou os 2	Escolheu Controle A	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F102	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F103	Antenou só Controle B	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F104	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F105	Antenou os 2	Escolheu Controle A	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F106	Antenou os 2	Escolheu Controle A	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão

Continuação

<u>Indivíduo</u>	<u>Primeira decisão</u>	<u>Segunda decisão</u>	<u>Lado com maior fluxo na etapa anterior</u>	<u>Réplica/Momento</u>
F107	Antenou os 2	Escolheu Controle A	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F108	Antenou só Controle B	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F109	Antenou só Controle B	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F110	Antenou só Controle B	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F111	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F112	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F113	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F114	Antenou só Controle B	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F115	Antenou os 2	Escolheu Controle A	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F116	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F117	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F118	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F119	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F120	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F121	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F122	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F123	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F124	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F125	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle B	Controle 3 - Antes da inversão
F126	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F127	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F128	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão

Continuação

<u>Indivíduo</u>	<u>Primeira decisão</u>	<u>Segunda decisão</u>	<u>Lado com maior fluxo na etapa anterior</u>	<u>Réplica/Momento</u>
F129	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F130	Antenou só Controle A	Escolheu Controle A	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F131	Antenou só Controle A	Fez U-turn	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F132	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F133	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F134	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F135	Antenou só Controle A	Escolheu Controle A	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F136	Antenou só Controle A	Escolheu Controle A	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F137	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F138	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F139	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F140	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F141	Antenou os 2	Fez U-turn	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F142	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F143	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F144	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F145	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F146	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F147	Antenou só Controle A	Fez U-turn	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F148	Antenou os 2	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F149	Antenou só Controle B	Escolheu Controle B	Controle A	Controle 3 - Após a inversão
F150	Antenou só Controle A	Escolheu Controle A	Controle A	Controle 3 - Após a inversão

APÊNDICE C

Experimento piloto ‘No entry’ em *Atta sexens rubropilosa*

O protocolo experimental usado nesse piloto foi semelhante ao usado no experimento com *Monomorium pharaonis*, mas as medidas dos labirintos foram adaptadas para o tamanho das formigas e o substrato usado para marcação foi vidro, e não papel (Figura 14).

Figura 14 – Labirinto usado para o experimento piloto com *Atta sexdens rubropilosa*

Fonte: autora.

Neste experimento-piloto, a subcolônia que estava no labirinto rosa/verde foi escolhida como a colônia teste e a colônia do labirinto rosa/laranja foi usada como colônia marcadora.

Na primeira parte do experimento, a subcolônia teste realizou o forrageamento e o carregamento de alimento em direção à colônia através dos dois braços. Embora o fluxo tenha sido superior no braço rosa é possível afirmar que houve marcação com feromônio de trilha nos dois lados, sendo assim suficiente para a realização da segunda parte.

No lado rosa ocorreu 12 carregamentos e no lado verde ocorreram cinco carregamentos em direção ao ninho. O primeiro carregamento no lado rosa ocorreu após 14 minutos de experimento e o primeiro carregamento no lado verde ocorreu após oito minutos de experimento. A distribuição de fluxo durante o forrageamento nos dois braços é apresentada a seguir (Figura 16).

Figura 15 - Distribuição do fluxo nos dois braços da colônia teste durante a primeira parte do experimento

Fonte: autora.

Por sua vez, a subcolônia marcadora, a qual recebeu alimento apenas no braço azul, apresentou um fluxo relativamente maior no lado com alimento, com uma grande quantidade de alimento sendo carregada. Embora o fluxo no lado

laranja exista, ele se manteve praticamente constante ao longo do experimento e chegou a zero nos últimos minutos.

No lado azul ocorreram 57 carregamentos em direção ao ninho. O primeiro carregamento ocorreu após quatro minutos de experimento. A distribuição de fluxo durante o forrageamento nos dois braços é apresentada a seguir (Figura 15).

Figura 16 - Distribuição do fluxo nos dois braços da colônia marcadora durante a primeira parte do experimento

Fonte: autora.

Após a retirada de todas as formigas do labirinto rosa/verde, as lâminas de vidro vindas do lado laranja da colônia marcadora foram posicionadas no lado rosa, que apresentou o maior fluxo na primeira parte do experimento e as lâminas com a marcação controle foram posicionadas no lado verde.

Das 25 formigas que subiram no labirinto e escolheram um dos lados, apenas três optaram pelo lado rosa, as outras 22 optaram claramente pelo lado verde, conforme mostrado na tabela 10 e figura 16 a seguir.

Tabela 10 - decisão de cada formiga na segunda parte do experimento

Formiga	Lado Rosa – ‘No Entry’	Lado Verde - Controle
1		1*
2	1*	
3	1	
4	1	
5		1
6		1
7		1
8		1*
9		1*
10		1
11		1
12		1
13		1*
14		1
15		1
16		1
17		1
18		1
19		1
20		1*
21		1
22		1
23		1
24		1
25		1

* Indica que a formiga realizou o comportamento de *U-turn*

Figura 17 - Número de escolhas para cada um dos lados (eixo positivo) e número de U-turns em cada um dos lados (eixo negativo)

Fonte: autora.