Universidade de São Paulo

Instituto de Psicologia

Fernanda Tiemi Nakashima Ferreira

**Forrageamento e Aprendizado Espaço-Temporal em
Formigas Cortadeiras (*Acromyrmex* sp.) na Presença de
Sacarose.**

**Foraging and Time-Place Learning in Leafcutter Ants
(*Acromyrmex* sp.) in the Presence of Sucrose.**

São Paulo

Fevereiro 2020

Fernanda Tiemi Nakashima Ferreira

**Forrageamento e Aprendizado Espaço-Temporal em
Formigas Cortadeiras (*Acromyrmex* sp.) na Presença de
Sacarose.**

**Foraging and Time-Place Learning in Leafcutter Ants
(*Acromyrmex* sp.) in the Presence of Sucrose.**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências, na área de Neurociências
e Comportamento.

Orientador: André Frazão Helene

*Dedico com todo amor ao meu pai Altino, minha mãe Maria Tomiko,
meus irmãos Naiane e Vinícius, e minha sobrinha Alexia por todo o
apoio.*

“...intelligence will be measured by the capacity for anticipation.”

(Victorian Britain Charles Babbage)

Agradecimentos

Ao orientador Prof. Dr. André Frazo Helene pela oportunidade de realizar este trabalho, por confiar e acreditar que seria possível e que eu seria capaz. Obrigada pela sua contribuição em vários aspectos do trabalho, pela sua paciência e compreensão, e pelo seu exemplo como profissional e como pessoa.

À Doutoranda Daniele Victoratti do Carmo por ter contribuído com o meu aprendizado sobre as formigas, os cuidados com o biotério, as sugestões em como proceder com o trabalho, além das conversas agradáveis.

Ao Marcelo Arruda Fiuza de Toledo por ter contribuído com os cuidados ao realizar o experimento e principalmente com a contagem das formigas e com a análise dos dados. Agradeço todo o apoio e disposição em me auxiliar.

Ao Doutorando Pedro Brisola Constantino em me auxiliar com as dúvidas sobre as formigas, o apoio para prosseguir com o meu experimento e com a análise dos dados.

Ao Pedro Leite Ribeiro pela disposição por ter colaborado com o meu trabalho e com sua opinião sobre o arranjo experimental.

À Mila Maria Pamplona Barbosa pelo apoio com as formigas, com a análise dos dados e pelas boas conversas.

Aos colegas do Laboratório de Ciências da Cognição pelo apoio, pelas ideias, e pelas conversas: Yanina, Pedro, Mila, Bruna, Patrícia, Karla.

Ao Técnico Manu pela colaboração e disposição em fornecer os recursos necessários para o experimento.

Ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP que me recebeu e possibilitou a realização do trabalho. Agradeço também pela oportunidade de ter ministrado aula no Curso de Inverno, a qual foi importante para o meu aprendizado.

Ao Programa de Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da USP que possibilitou a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais pelo apoio e pela compreensão e por sempre me darem suporte para que pudesse seguir com os estudos. Agradeço aos meus irmãos e minha sobrinha por sempre me apoiarem quando preciso.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Resumo

As formigas podem ajustar suas atividades de acordo com o estímulo que recebem do ambiente. Se as unidades da colônia podem se adaptar através da auto-organização, o próprio sistema também pode se adaptar e adquirir novas características. As formigas são capazes de se orientar espacialmente e sincronizar seu ritmo endógeno com o horário de algum alimento. Assim, quando a recompensa estiver presente estarão mais preparadas para formar a trilha de forrageamento para a sua coleta. O objetivo do trabalho é verificar se as colônias de formigas *Acromyrmex* sp. respondem à presença da sacarose através do aprendido espaço-temporal. Para este estudo, duas trilhas em direções opostas davam acesso ao ninho. Somente uma das trilhas levava à sacarose, que foi colocada por 1h durante 21 dias consecutivos no mesmo local e horário. No 22º dia não foi fornecido o açúcar. Para cada trilha foi instalada uma câmera para gravar o fluxo de indivíduos em 4 horários diferentes: controle 1 (pré-sacarose – 10 a 11h), antecipação (11h30 a 12h), sacarose (12 a 13h) e controle 2 (pós-sacarose – 14 a 15h). No 21º dia as formigas foram marcadas e no dia seguinte, observadas. Os dados analisados mostraram que: (1) as formigas responderam positivamente ao estímulo apresentado através da formação da trilha de forrageamento para coletar a sacarose; (2) o efeito provocado pela sacarose ainda foi possível de ser observado no horário controle 2, como o açúcar já tinha sido retirado o fluxo não foi intenso, mas foi significativamente maior do que na trilha oposta; (3) as colônias tiveram aprendizado espacial na 3ª semana de experimento, pois o fluxo de indivíduos foi significativamente maior na trilha com acesso à sacarose; (4) na 2ª semana, as colônias estavam no local correto com antecedência de 10 minutos e na 3ª semana, com 20 minutos, indicando aprendizado espaço-temporal progressivo; (5) no 22º dia as formigas se apresentaram com 10 minutos de antecedência e permaneceram no local correto até o horário controle 2; (6) as formigas marcadas indicaram ter preferência em forragear em determinado local, mesmo que ele não ofereça algum tipo de recompensa. As colônias foram capazes de aprender onde e quando procurar por alimento. Devido ao ajuste das formigas aos estímulos do ambiente e às características de auto-organização da colônia foi possível a preparação para a coleta da sacarose e o sucesso no forrageamento para a colônia como um todo.

Abstract

Ants can adjust their activities according to the stimulus they receive from the environment. If the colony's units can adapt through self-organization, the system itself can also adapt and acquire new characteristics. Ants are able to orient themselves spatially and synchronize their endogenous rhythm with the time of the food. Thus, when the reward is present, they will be better prepared to form the foraging trail for their collection. The objective of the work is to verify if the colonies of ants *Acromyrmex* sp. respond to the presence of sucrose through time-place learning. For this study, two trails in opposite directions gave access to the nest. Only one of the trails led to sucrose, which was placed for 1h for 21 consecutive days at the same place (2 possible) and time (4 possible). On the 22nd day sugar was not supplied. A camera was installed for each track to record the flow of individuals at 4 different times: control 1 (pre-sucrose – 10-11h), anticipation (11h30 – 12h), sucrose (12-13h) and control 2 (post-sucrose – 14-15h). On the 21st day the ants were marked and the next day, observed. The analyzed data showed that: (1) the ants responded positively to the stimulus presented by forming the foraging trail to collect sucrose; (2) the effect caused by sucrose was still possible to be observed at control time 2, as the sugar had already been removed, the flow was not intense, but it was significantly greater than on the opposite trail; (3) the colonies had spatial learning in the 3rd week of the experiment, as the flow of individuals was significantly greater on the trail with access to sucrose; (4) in the 2nd week, the colonies were in the correct place 10 minutes in advance and in the 3rd week, with 20 minutes, indicating progressive time-place learning; (5) on the 22nd day, the ants presented themselves 10 minutes in advance and remained in the correct place until control time 2; (6) the marked ants indicated that they prefer to forage in a certain location, even if it does not offer any type of reward. The colonies were able to learn where and when to look for food. Due to the adjustment of the ants to the stimuli of the environment and the characteristics of self-organization of the colony, it was possible to prepare for the collection of sucrose and the success in foraging for the colony as a whole.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
1.1 Eussocialidade	2
1.1.1 <i>Formação e Organização da Colônia</i>	<i>2</i>
1.2 A Colônia Como um Sistema	3
1.2.1 <i>Interação Formiga X Colônia</i>	<i>5</i>
1.3 Formigas Cortadeiras	6
1.3.1 <i>Acromyrmex sp.</i>	<i>6</i>
1.4 Forrageamento	7
1.4.1 <i>Formação de Trilha.....</i>	<i>7</i>
1.4.2 <i>O Papel do Indivíduo na Sociedade.....</i>	<i>9</i>
1.4.3 <i>Plasticidade Comportamental.....</i>	<i>11</i>
1.5 Memória e Aprendizado Espaço-Temporal	12
1.5.1 <i>Orientação Espacial.....</i>	<i>12</i>
1.5.2 <i>Ritmicidade.....</i>	<i>13</i>
1.5.3 <i>Orientação Espaço-Temporal.....</i>	<i>15</i>
1.6 Considerações Finais	17
II. OBJETIVOS.....	18
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Animais Experimentais.....	20
3.2 Arranjo Experimental	20
3.3 Contagem do Fluxo de Indivíduos.....	22
3.4 Marcação das formigas	22
3.5 Análise dos Dados.....	23
IV. RESULTADOS	24
4.1 Visão Global do Fluxo de Formigas	24
4.1.1 <i>Atividade de Forrageamento na Trilha da Sacarose</i>	<i>25</i>
4.1.2 <i>Atividade de Forrageamento na Trilha Controle</i>	<i>26</i>
4.2 Análise do Horário da Sacarose.....	26
4.3 Análise dos Horários Controles (HC1 e HC2).....	27
4.4 Resposta Antecipatória.....	28

4.4.1 Análise dos Minutos Durante HA.....	29
4.4.2 Análise dos Minutos Durante HS.....	31
4.5 Análise do Dia Sem a Disponibilização da Sacarose (22° Dia)	32
4.6 Análise das formigas marcadas.....	34
V. DISCUSSÃO	36
5.1 Forrageamento em <i>Acromyrmex</i>.....	36
5.1.1 Efeito da Sacarose nas Trilhas de Forrageamento	37
5.1.2 O Efeito Indutor de Antecipação da Sacarose em HS	37
5.1.3 Declínio do Forrageamento em HC2	38
5.2 Comportamento Antecipatório à Sacarose	38
5.2.1 Aprendizado Espacial.....	39
5.2.2 Aprendizado Espaço-Temporal	39
5.2.3 Considerações do Aprendizado Espaço-Temporal na Colônia	42
5.2.4 Padrões Individuais	43
VI CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS	45

I. INTRODUÇÃO

A capacidade de alterar o comportamento a partir de uma experiência prévia está relacionada à antecipação de eventos recorrentes a partir da apreensão do valor informativo de pistas ambientais. Tais pistas podem ser as mais diferentes, como aquelas envolvidas no aprendizado do local e horário da apresentação de um estímulo. Assim, na presença de um estímulo relevante, como um alimento nutritivo, um animal pode aprender informações sobre onde e quando estava recebendo a recompensa, de forma a poder antecipar tal evento com base nestas pistas e maximizar seu acesso à recompensa em condições posteriores.

A pergunta que se faz aqui é se as formigas cortadeiras *Acromyrmex* sp. são capazes de aprender informações sobre tempo e espaço da apresentação de um estímulo alimentar. Mais ainda, se podemos observar a consequente antecipação de tal aprendizado. Para realizar esse desafio, as formigas precisam executar algumas tarefas e trataremos aqui dos temas que devem ser levados em consideração para circunscrever os aspectos envolvidos nestas tarefas.

Para estabelecer a exploração de uma fonte alimentar, primeiramente, as formigas precisam localizar esse alimento, em seguida formar uma trilha de forrageamento para a sua coleta e, então, proceder o seu transporte até o ninho. Já para a antecipação, após um período de treinamento elas precisam aprender a se localizar, com o auxílio da memória espacial ou uso seletivo de pistas químicas e a estarem previamente no lugar esperado utilizando a memória temporal, o que presumivelmente estará vinculado à marcadores de ritmicidade.

Esse suposto conjunto de comportamentos será testado na colônia como um todo, por essa razão o trabalho aborda a eussocialidade. Complementarmente, sendo a coletividade, a expressão de conjunto de insetos individuais inseridos em um sistema complexo, trataremos também do papel que individualmente as formigas podem ter nesse processo. Para uma melhor compreensão, a forma como os temas estão relacionados podem ser observados na Figura 1.

Figura 1: Fluxograma dos elementos envolvidos para o aprendizado espaço-temporal das formigas *Acromyrmex* sp.

1.1 Eussocialidade

Todas as formigas e cupins, assim como algumas abelhas e vespas são considerados insetos eussociais (HOLLOBLER e WILSON, 1994). Este grupo compreende 75% da biomassa de insetos apresentando um grande sucesso ecológico (WILSON, 1990). A eussocialidade, que está relacionada com a organização desses insetos, é definida quando três critérios estão presentes: o cuidado coletivo da prole, a sobreposição de pelo menos duas gerações na mesma sociedade e a divisão de trabalho reprodutivo (HOLLOBLER e WILSON, 2011). O terceiro critério, que apresenta uma casta responsável pela reprodução e uma casta responsável pelas demais funções da colônia, é o que define especialmente a eussocialidade - socialidade verdadeira ou completa (DIEHL, 2006). Através da combinação destes critérios foi possível formar as maiores e mais sofisticadas sociedades de insetos (HOLLOBLER e WILSON, 1994).

1.1.1 Formação e Organização da Colônia

O início de qualquer ninho se dá pela formação da colônia por uma única rainha, processo no qual cada rainha precisa apresentar uma série de habilidades desde sua saída do ninho original até estabelecer um novo ninho. Muito resumidamente, a rainha

deixa o ninho mãe, acasala, procura um lugar apropriado, constrói seu ninho e cria sua prole. Assim que as primeiras operárias começam a executar suas atividades, a rainha reduz seu trabalho e sua vida não será mais do que realizar a postura de ovos e receber alimento (OSTER e WILSON, 1978). As operárias, que são inférteis, realizam o restante das tarefas que envolvem atividades que vão desde o cuidado com a rainha, dos ovos e das pupas, construção e manutenção do ninho, a busca por alimento até a defesa do ninho (WILSON, 1980). Conforme a colônia cresce de tamanho e os grupos de castas se formam, o repertório de trabalho diminui. A divisão de trabalho é acompanhada dessa perda do repertório comportamental do indivíduo. Por outro lado, o repertório das atividades da colônia como um todo aumenta (OSTER e WILSON, 1978).

Segundo Wilson (1980), os diferentes tamanhos corporais (polimorfismo) das operárias estão relacionados com a divisão de trabalho. Tal especialização ocorreria devido à impossibilidade de um padrão morfotípico único realizar todas as tarefas necessárias em uma colônia, com a mesma eficiência. A combinação da cooperação e da divisão de trabalho garante uma tremenda vantagem para os insetos sociais. Além disso, de acordo com Wilson (2000), o aumento do número e do grau de especialização das operárias associado ao aumento das formas de comunicação pelos quais os indivíduos coordenam suas atividades contribuem para a organização da colônia. A colônia, assim como um organismo, se desenvolve através da diferenciação e da integração das suas partes.

1.2 A Colônia Como um Sistema

Para Morley (1958), a sociedade das formigas é complexa, mas a estrutura e o comportamento das unidades que as compõem são simples. A palavra “complexo” origina do latim, *plexus*, que significa “trançado ou entrelaçado” e, *com*, significa “junto”, formando “trançado junto” (GELL-MANN, 2002). Heylighen (1988) afirma que para ter um complexo é preciso ter duas ou mais partes ou elementos e essas partes devem estar conectadas. Por isso, existe uma dualidade entre as partes que ao mesmo tempo são distintas e estão conectadas. Portanto, um complexo não deve ser visto como uma unidade, pois, é composto de partes diferentes; tampouco pode ser separado sem ser destruído.

Segundo Page (2011), um sistema complexo consiste de diversas unidades que interagem formando uma rede. As ações dessas unidades são interdependentes, de modo que o que cada formiga faz afeta as outras. Se as unidades se adaptam, o sistema tem grande capacidade de responder às mudanças do ambiente. Neste caso, ele é um Sistema Complexo Adaptativo. De acordo com Holldobler e Wilson (2011), as colônias são mais do que a soma de suas partes, elas são unidades operacionais com traços emergentes provenientes das interações dos seus membros.

Alguns autores trataram da auto-organização, originalmente desenvolvida no contexto da química e da física, aplicada ao comportamento de insetos sociais para tratar de que forma as interações, entre os indivíduos que exibem comportamentos simples, são a causa do comportamento coletivo complexo (BONABEAU *et al.*, 1997). “A auto-organização é um processo no qual um padrão a nível global do sistema emerge exclusivamente das numerosas interações entre os componentes do sistema.” (CAMAZINE *et al.*, 2001, p. 8).

A emergência se refere aos processos em que o sistema exprime novas propriedades através da interação entre as subunidades. Não existe um comando central ou um líder, as interações ocorrem de modo descentralizado e não-lineares podendo resultar em padrões complexos (CAMAZINE *et al.*, 2001). Devido a isso, a emergência não ocorre por um agente externo, mas sim por interações internas autorreguladas, por isso corresponde ao que é chamado de auto-organização (HEYLIGHEN, 1988; BESHES e FEWELL, 2001).

No comportamento dos indivíduos, regras correspondem a um estímulo-resposta baseado na mudança do estado interno ou motivacional do indivíduo, que envolve múltiplas interações na forma de ciclos de *feedback* positivo ou negativo. Essas interações permitem uma mudança na característica do sistema e proporcionam novos estímulos para interações adicionais. Enquanto o *feedback* positivo envolve comportamentos específicos dos indivíduos, como o recrutamento; o *feedback* negativo ocorre devido à consequência de limitações ou restrições do sistema, como a escassez de recursos ou o consumo de alimento (DENEUBOURG *et al.*, 1999).

1.2.1 Interação Formiga X Colônia

Há diversos processos de regulação do comportamento coletivo que podem ser observados em organismos eussociais. Por exemplo, se uma formiga “preguiçosa” for colocada ao lado de outra já empenhada em alguma tarefa, ela não somente se engajará na tarefa, mas o fará mais energicamente do que se estivesse isolada. Fenômenos de comportamento de multidões são diferentes dos de indivíduos. Basta que deem o exemplo, e as outras formigas os imitam ou simplesmente são levadas a fazer o mesmo. Segundo essa hipótese, a memória e o aprendizado poderiam ser expressos por meio da ação de alguns poucos indivíduos e repetidos por muitos (MORLEY, 1958).

Por outro lado, para Gordon (2018), a colônia também tem memória e ela surge de mudanças na forma como as formigas interagem e essas mudanças no comportamento da colônia não são a simples soma de memória de algumas formigas. O que acontece em um dia afeta o comportamento da colônia no próximo dia. Devido a isso, se as formigas ficam expostas a um mesmo estímulo durante alguns dias, elas continuam a agir da mesma maneira ainda que o estímulo tenha cessado. Mesmo que as formigas já tenham trocado de tarefa, os padrões de interações permanecem por um tempo para, então, retornarem ao estado anterior. Os indivíduos não se lembravam do ocorrido, mas a colônia lembrava (Gordon, 2018).

A atuação da colônia também foi observada por pesquisadores que, em suas observações pessoais, verificaram que as escoteiras nem sempre foram bem sucedidas em recrutar outras formigas. Eles sugeriram que algum controle da colônia pode ter impedido o recrutamento. Também levantaram a hipótese de que o número de escoteiras forrageando pode estar relacionado ao estado de fome da colônia. Portanto, seriam aspectos que poderiam ser regulados coletivamente (FRANK e LINSÉNMAIR, 2017).

Tratando um modelo menos simplista e que impõe a necessidade de tratar da colônia como entidade *per se*, alguns autores tratam de como a memória estaria presente no processo. A interação entre as formigas e a colônia tem um papel de importância no estudo da auto-organização e no comportamento emergente dos sistemas complexos (CAMAZINE *et al.*, 2001). Segundo Feinerman e Korman (2017), a formiga é cognitivamente capaz de processar informações que, geralmente, são importantes para a colônia. Já a cognição que emerge a um nível da colônia é sujeito

às restrições decorrentes, principalmente, da autonomia das formigas da própria colônia. Dessa forma, ocorre simultaneamente um benefício de ações individuais e coletivas, permitindo que o sistema aproveite tanto as informações de escala micro quanto macro-organizacional.

1.3 Formigas Cortadeiras

As formigas cortadeiras são membros da tribo Attini e cultivam um fungo simbiote, o que aumenta a complexidade do sistema ao introduzir outro elemento (WEBER, 1972). São conhecidas como “saúvas” e “quenquéns”, pertencendo aos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Formicidae, Myrmicinae, Attini), respectivamente (MAPA, 2016). Na natureza, elas realizam o corte de material vegetal e o transportam até o formigueiro, onde é usado como meio de cultura do fungo do qual se alimentam. Em laboratório, foi descrito que as forrageadoras também se alimentam diretamente da seiva da planta (HOLLOBLER e WILSON, 2011).

1.3.1 *Acromyrmex* sp.

O gênero *Acromyrmex* é próprio da América e existe em todos os estados do Brasil (GONÇALVES, 1961). Esse gênero, algumas vezes, pode superar as saúvas em abundância tendo maior lugar de importância em áreas de pastagens e de reflorestamento (GOMIDES *et al.*, 1997). As operárias se caracterizam por apresentarem exemplares de diversos tamanhos, podendo medir de 2 mm a 10,5 mm (GONÇALVES, 1961). A divisão de trabalho nas formigas cortadeiras é baseada no tamanho das operárias que influencia na otimização do gasto energético. Enquanto as formigas forrageadoras realizam o corte das folhas, pois são grandes e menos eficientes para o cultivo do fungo; as jardineiras, que são menores, cuidam do fungo devido à ineficiência para o corte vegetal (WILSON, 2000).

Wetterer (1999) afirmou que as colônias de *Acromyrmex* apresentam uma divisão de trabalho, geralmente, baseada em duas castas fisicamente distintas ou dimorfismo: as operárias menores que realizam tarefas predominantemente dentro do ninho; e as operárias maiores que são responsáveis pelo forrageamento. Forti *et al.* (2004) levantaram a hipótese de quatro castas em *Acromyrmex subterraneus brunneus*: operárias grandes, médias, pequenas e muito pequenas; e mencionaram a

necessidade de um estudo comportamental envolvendo todas as atividades dos componentes da colônia. Neste trabalho, o foco são as formigas responsáveis pelo forrageamento.

1.4 Forrageamento

Roces e Núñez (1993) definem o forrageamento como um processo complexo que resulta da atividade dos indivíduos e dos aspectos emergentes provenientes das interações entre os membros da colônia. As formigas escoteiras são as responsáveis por interagir com as outras formigas para dar início ao recrutamento e também por regular o comportamento delas para que o forrageamento seja eficiente (FRANK e LINSENMAIR, 2017). A atividade envolve a utilização de trilhas de feromônio e a lembrança das rotas pelas quais estiveram (CZACZKES *et al.*, 2013).

1.4.1 Formação de Trilha

Segundo Roces e Núñez (1993) as formigas formam trilhas quando encontram uma fonte de alimento nutritivo. Para essa formação é necessária uma resposta da colônia que decorre de decisões tomadas por cada indivíduo. O forrageamento envolve algumas características, como a avaliação da qualidade dos recursos pelas forrageadoras, a tomada de decisão, o transporte de alimentos e a transferência de informações (BOLLAZZI e ROCES, 2011) como veremos a seguir.

Fora do formigueiro, as formigas cumprem suas tarefas na mesma sequência todos os dias. Ao sair do ninho, as escoteiras tendem a andar em ziguezague, investigam e interagem, parando frequentemente para inspecionar o terreno ou outras formigas. Movem-se em torno da superfície do ninho e por fim se espalham a maior distância dele, escolhendo a direção a seguir. Quando o patrulhamento chega ao auge, as forrageadoras saem do ninho. Frequentemente, a primeira centena de forrageadoras se espalha num leque, e mais tarde, a base do leque ao lado do ninho se torna mais linear e a trilha ganha forma. Elas coletam o alimento e retornam para o ninho (GORDON, 2002).

Cada formiga que retorna, estimula outra a forragear, e assim por diante. Esse processo de rápido crescimento populacional não continua infinitamente pela simples

razão de que quando todas as forrageadoras disponíveis forem recrutadas não resta mais nenhuma para forragear. O quantidade de indivíduos na trilha atinge um platô. O recrutamento realizado por estes insetos é um mecanismo que possibilita reunir rapidamente um grande número de forrageadoras em direção a um desejável recurso alimentar (CAMAZINE *et al.*, 2001). A comunicação entre as partes permite a localização do alimento, além de regular a atividade de forrageamento e de recordar o local onde foi encontrada uma recompensa (JACKSON e RATNIEKS, 2006).

A coleta de alimento consome tempo e energia e o desempenho do forrageamento da colônia está relacionado com a comunicação que pode ser transferida de forma individual, como o encontro de cabeça entre as formigas (CARMO, 2014), que é regulado pela taxa de contato (GORDON, 2002) e de forma coletiva, principalmente, através do feromônio. A comunicação é importante para a integração das partes. As formigas marcam a rota com feromônios para o recrutamento e formação das trilhas de forrageamento em massa (WILSON, 1990; GORDON, 2002). Quanto mais indivíduos depositam o feromônio, mais indivíduos são recrutados (Figura 2). Nessa fase de crescimento exponencial do número de formigas ocorre o processo de *feedback* positivo, uma amplificação, que gera uma mudança no sistema (CAMAZINE *et al.*, 2001).

Figura 2: Fluxograma para a formação de trilha de forrageamento de formigas.

Para que ocorra um controle durante o recrutamento, a concentração de feromônio depositado na trilha é modulado pelas formigas. Como a quantidade de formigas que seguem em direção ao ninho coincide com a taxa máxima do número dos indivíduos que vão para o alimento, sugere-se que aquelas que retornam para o formigueiro devem reduzir a quantidade de feromônio secretado de acordo com a densidade de formigas no local de forrageamento (JAFFE e HOWSE, 1979). Além disso, a deposição de feromônio é reduzido quando seu nível se encontrado alto na

trilha (CZACZKES *et al.*, 2013); quando as formigas possuem uma memória da rota que foi utilizada anteriormente; e na presença de hidrocarboneto cuticular (CHC) (CZACZKES *et al.*; 2012).

Altos níveis de CHC indicam que o alimento foi visitado frequentemente e que é seguro. Essa cutícula não volátil é composta de lipídeos e também é importante na comunicação dos insetos. (CZACZKES *et al.*; 2012). Esses meios de controlar o desempenho das atividades e evitar tarefas desnecessárias durante o recrutamento são processos de *feedback* negativo que ocorre se houver a exaustão do alimento, número limitado de forrageadoras, competição entre fontes de alimento, saciedade e aglomeração na fonte alimentar (BONABEAU *et al.*, 1997). Colônias de formigas cortadeiras podem ser enormes, alcançando alguns milhões de indivíduos e inseriram uma nova dimensão no desafio explicativo de suas dinâmicas. Tal desafio envolve tanto os aspectos individuais e coletivos, quanto de comunicação etc.

1.4.2 O Papel do Indivíduo na Sociedade

Em 1958, Morley propôs que existiriam diferenças no comportamento das operárias consideradas individualmente. Alguns milhares desses indivíduos dentre os milhões que habitam a colônia, se lançariam ao trabalho com vigor e determinação. Alertas e ativos, esses são os “centros de excitação” que fazem vibrar a colônia. Suas tarefas dependem do resultado da lembrança de outros dias, do estímulo para ação imediata que lhes vem do ambiente e de suas próprias necessidades orgânicas. A importância das formigas centro-de-excitação não está apenas na direção de atividade mas também como órgãos de exploração e aprendizado da colônia.

Esse modelo explicativo acerca da emergência de padrões organizacionais em sistemas coletivos tenta impor uma direcionalidade comportamental ao sistema estabelecida por um grupo com uma forte tendência à ação organizada. Gordon (2002) afirma que se as escoteiras não retornam em segurança para o ninho, as forrageadoras não saem para procurar alimento. A relevância dessas formigas escoteiras pode ser verificada nos experimentos de Roces e Núñez (1993) com a *Acromyrmex lundii* e soluções de sacarose a 1% e 10%. No teste, quando a primeira formiga encontrou a solução e retornou para o ninho, a sacarose foi substituída por um pedaço de parafilme. Foi verificado que na solução mais concentrada, as formigas

recrutadas cortaram fragmentos menores, foram mais velozes para retornar ao ninho e a marcação da trilha foi mais intensa.

Um segundo experimento foi realizado para verificar se o peso do material coletado influenciou na velocidade. Dessa vez, as operárias recrutadas encontraram pedaços de filtro de papel com tamanhos iguais. Não houve o corte de fragmentos, somente a coleta e o transporte do filtro de papel. Os dados mostraram que as formigas recrutadas pela solução de 10% foram mais rápidas para retornar ao ninho do que as recrutadas pela de 1%, e não tendo relação entre velocidade e peso em ambas as condições. A princípio, os indivíduos recrutados parecem confiar nas decisões da primeira operária que retornou ao ninho (ROCES e NÚÑEZ, 1993).

A decisão de transferir a informação sobre a nova descoberta do alimento motivou a operária a cortar pedaços menores e a retornar ao ninho o mais breve possível para recrutar mais indivíduos na condição da solução da sacarose a 10%. A operária sacrifica sua taxa de entrega, mas a colônia aumenta sua taxa de coleta devido ao recrutamento (ROCES e NÚÑEZ, 1993). Rocés (2002) sugere a economia no tempo de corte ao cortar fragmentos pequenos e a economia no tempo de retorno ao serem mais velozes. Economizar tempo seria importante para monopolizar a fonte de alimento e o reforço da trilha seria para amplificar o processo de recrutar mais indivíduos.

As decisões dos indivíduos permitem que o recrutamento ocorra o mais breve possível para o benefício da própria colônia. De acordo com Frank e Linsenmair (2017), as formigas escoteiras são as responsáveis pelo controle do comportamento da colônia. Elas precisam saber quais são as necessidades da colônia e obter informações suficientes sobre o alimento para decidir se há necessidade de recrutamento e se houver, decidir se deve recrutar poucos ou muitos indivíduos. Nas formigas *Megaponera analis*, as operárias que têm o papel de escoteiras representam 1% da colônia e elas têm o potencial de influenciar o destino das outras 99% e a influenciar a eficiência do forrageamento. Resumidamente, os sistemas coletivos são capazes de gerar respostas adaptativas e flexíveis através da auto-organização.

1.4.3 Plasticidade Comportamental

A plasticidade comportamental é importante para que as formigas possam ter maior sucesso no forrageamento. O padrão de comportamento de uma colônia vai além de uma simples aglomeração errática de indivíduos. Dessa forma, quando bem estruturada, a colônia pode expressar um comportamento para explorar melhor um local e responder de forma mais rápida e eficiente às possíveis circunstâncias (OSTER e WILSON, 1978). Supostamente, regras associam a experiência de uma formiga com sua próxima ação, pois quando as formigas se comunicam informações são processadas e elas tomam decisões que refletem no comportamento da colônia (GORDON, 2002).

Ao menos parte da plasticidade é fruto do fato de uma operária poder executar suas tarefas mudando essa tarefa de acordo com as circunstâncias. Os indivíduos constantemente alteram suas atividades de duas maneiras, substituindo uma tarefa por outra, ou mudando do estado de repouso para o estado ativo. Tal ajuste é aparentemente generalizado em insetos sociais. (GORDON, 1996). Como foi comentado, muitas formigas estão divididas em castas e portanto apresentam um padrão de comportamento por pertencer a uma dada casta, mesmo assim elas podem executar outros papéis quando necessário (OSTER e WILSON, 1978).

A plasticidade parece ser produto, ao menos em parte, da forma como o engajamento nas tarefas define a estrutura coletiva. O desempenho das formigas *Atta sexdens rubropilosa*, é um exemplo da plasticidade comportamental, pois elas foram capazes de migrar de uma estratégia de trilhas bidirecionais para unidirecionais durante o forrageamento (RIBEIRO *et al.*, 2009). Como as pistas do ambiente não se mantêm constantes, as formigas precisam ter a habilidade de responder às mudanças (FREAS e SCHULTHEISS, 2018) se comunicando através de interações simples para gerar o novo comportamento da colônia (GORDON, 2018).

De forma resumida é possível observar que enquanto um indivíduo solitário pode realizar poucas tarefas em somente um local, uma sociedade de insetos pode realizar várias atividades e estar em diversos lugares ao mesmo tempo (HOLLOBLER e WILSON, 2011). Por outro lado, pequenas alterações individuais podem gerar padrões coletivos amplamente diferentes. Assim, a combinação de ações individuais e coletivas tem enorme impacto tanto na eficiência do sistema quanto em sua flexibilidade.

1.5 Memória e Aprendizado Espaço-Temporal

Informações associadas ao como obter um determinado alimento são fundamentais. Por exemplo, é fácil observar que as abelhas e as formigas viajam centenas de metros por dia entre o ninho e uma fonte alimentar (COLLETT, 1992). Assim como o tipo de alimento e onde este pode ser obtido, o tempo é uma dimensão essencial para que os animais possam sobreviver no ambiente. De fato, as informações adquiridas acerca do tempo e espaço precisam ser controladas pelos insetos para definir o sucesso no forrageamento (FOURCASSIÉ *et al.*, 1999). Abaixo serão abordados, portanto, temas de orientação espacial, ritmicidade e orientação espaço-temporal.

1.5.1 Orientação Espacial

Durante o processo inicial de exploração para o forrageamento, o principal sistema de navegação utilizado pelos insetos para traçar o caminho entre o ninho e a fonte alimentar é a integração de caminhos. Esse sistema permite que durante toda a viagem o indivíduo esteja vinculado ao início, o ninho. Sem esse vínculo, se forem colocadas em um local desconhecido, os indivíduos seguem em direções aleatórias. Além dos vetores, informações da rota baseadas em pontos de referência também são utilizados (WEHNER *et al.*, 1990; COLLETT, 1992).

Quando ocorre a partida e o retorno para o ninho repetidas vezes, pelo mesmo vetor, novas informações são adicionadas às informações vetoriais originais permitindo a atualização constante dessa rota (WEHNER *et al.*, 1990), pois os insetos podem aprender uma variedade de pistas, como a visual, olfativa, magnética, e associá-las com o ninho (FREAS e SCHULTHEISS, 2018).

Geralmente, os insetos seguem por caminhos estereotipados ao transitarem entre dois lugares conhecidos (COLLETT *et al.*, 1992), portanto, são capazes de possuir memória espacial. Harrison *et al.* (1989) verificaram que as formigas *Paraponera clavata* inicialmente utilizam a trilha com feromônio para se orientarem até o alimento enquanto as que já realizaram o percurso mais vezes, preferencialmente, seguem pelo caminho que tem pistas como referência, que são

provavelmente visuais. Os indivíduos com experiência também foram mais rápidos, 4,59 m/min, do que as iniciantes, 2,24 m/min, para coletar a comida. Schatz *et al.* (1999) também verificaram que a duração da viagem de formigas pode diminuir com o aprendizado.

Chameron *et al.* (1998) descobriram que as formigas *Cataglyphis cursor* são capazes de aprender a rota de um labirinto que apresentava uma sequência de quatro caixas. Cada caixa tinha uma entrada e duas saídas, cada saída continha uma pista visual e uma das saídas era bloqueada. Collett *et al.* (1992) afirmam que as formigas memorizam as características visuais dos pontos de referência que encontram no caminho. Chameron *et al.* (1998) utilizaram um recipiente contendo sacarose como recompensa no experimento que totalizou 65 dias. É provável que com o passar dos dias, as formigas já estavam esperando pelo sacarose que era fornecida diariamente.

1.5.2 Ritmicidade

Sabemos intuitivamente que o tempo passa, independente da nossa vontade. Uma das sensações mais nítidas que temos é a existência de ciclos, ou seja, fenômenos que se repetem de tempos em tempos, sugerindo uma imagem de avanço no tempo em círculos ou em espiral. Os seres vivos normalmente expressam esses ciclos de forma bem clara, através de hábitos diurnos ou noturnos, sono e vigília, reprodução, etc.

Hoje sabemos que tais ciclos estão presentes não apenas nesse nível mais geral do comportamento das espécies, mas são encontrados em todos os níveis de organização dos seres vivos: desde funções moleculares até comportamento social. (CIPOLLA-NETO *et al.*, 1988, p. 15)

Um exemplo dos ciclos vivenciados pelos organismos envolve o padrão de abertura do botão floral, observado em algumas plantas, que se abrem e se fecham periodicamente. Essa observação foi feita por Carl Linnaeus que fez um desenho de uma sequência de flores constituindo um tipo de relógio floral. Linnaeus não tinha conhecimento sobre a duração da fase de luz do ciclo claro/escuro (fotoperiodismo) e muitas das plantas que ele selecionou eram espécies de dia longo. No entanto, a periodicidade do abrir e fechar das flores está relacionado com o ritmo endógeno das plantas e o comprimento do dia (GARDINER, 1987).

Os seres vivos possuem um relógio biológico ou oscilador endógeno que possibilita que os ritmos endógenos fiquem sincronizados com os ritmos do ambiente. O que mantém essa sincronização dos ritmos endógenos aos eventos cíclicos do ambiente é o ajuste a cada ciclo, que é denominado arrastamento (CIPOLLA-NETO *et al.*, 1988; ASCHOFF, 1989). Os fatores ambientais capazes de arrastar os ritmos endógenos são denominados *zeitgebers* (ASCHOFF, 1989).

Com relação ao ritmo circadiano, sincronizado pelo ciclo claro e escuro, foi realizado um estudo com uma colônia de formiga cortadeira, *Atta sexdens rubropilosa*. Para o experimento foram gravados vídeos das formigas transitando entre o ninho e local com alimento através de uma trilha. Ao longo de seis dias, a gravação foi realizada durante 2 minutos com intervalo de 8 minutos. Os resultados mostraram uma intensa atividade na fase escura do dia, indicando hábitos noturnos. Contudo, o padrão temporal de uma colônia não corresponde necessariamente ao ritmo de cada formiga. A possibilidade de alternância dos indivíduos ao executarem uma tarefa seria suficiente para que se estabeleça um padrão da colônia (TOLEDO, 2013). Essa questão foi investigada no estudo a seguir com a divisão temporal das tarefas.

Utilizando a mesma espécie de formiga, foi realizado outro estudo com seis colônias para verificar a existência de divisão temporal de tarefas devido a importância do polimorfismo neste grupo. No primeiro dia, as formigas foram marcadas em dois momentos tanto na fase de claro (10-12h e 14-16h) quanto na fase de escuro (22-24h e 2-4h), sendo que o padrão de marcação foi diferente para cada momento. Nos 5 dias subsequentes, a trilha que conectava a colônia ao local do alimento foi gravada nos mesmos horários em que foi realizada a marcação. Os resultados mostraram que as formigas forrageiam preferencialmente no mesmo horário, portanto, ocorre a divisão temporal das tarefas. Também foi verificado indivíduos com tamanhos maiores na fase de claro, possivelmente para terem mais eficiência no forrageamento. Por fim, a quantidade de formigas observadas no claro foi menor, o que corrobora com o experimento anterior (CONSTANTINO, 2017).

Os relógios biológicos dos insetos estão localizados no cérebro e nos órgãos periféricos. Sabe-se que o relógio cerebral controla principalmente o comportamento enquanto os relógios periféricos estão relacionados com o controle das glândulas endócrinas, do canal alimentar e da reprodução. Ainda não se sabe como os sistemas circadianos estão organizados nos insetos e pouco se sabe sobre as relações entre os vários relógios nos insetos e a natureza dos ritmos que eles controlam

(GIEBULTOWICZ, 2000). A expressão de um ritmo biológico possibilita a preparação para se antecipar e interagir, de forma sincronizada e eficiente, com os eventos periódicos que se apresentam (CIPOLLA-NETO *et al.*, 1988).

1.5.3 Orientação Espaço-Temporal

Os animais e os humanos se comportam de modo preditivo, como se algo que ocorreu uma vez fosse acontecer novamente. É razoável assumir que a capacidade de se antecipar a um evento contribui para o sucesso adaptativo do organismo. (REZNIKOVA, 2007). Existem animais que podem aprender quando e onde procurar por comida, como os ratos (WALL *et al.*, 2019), os pássaros (TELLO-RAMOS *et al.*, 2015), as abelhas (MURPHY e BREED, 2008), assim como as formigas neotropicais (SCHATZ *et al.*, 1999).

É possível presumir que o desempenho dos animais frente a desafios ambientais será maior quando a presença deste desafio puder ser antecipada. Isso permite não apenas a antecipação *per se* a um estímulo, com uma resposta que antecede o próprio desafio, mas oferece a possibilidade de preparação a este estímulo, aumentando a chance de sucesso de uma resposta (CIPOLLA-NETO *et al.*, 1988). Para isso, deve acontecer o aprendizado espaço-temporal que de acordo com Beugnon *et al.* (1995), Fourcassié *et al.* (1999), Murphy e Breed (2008) ocorre quando o animal é treinado a se alimentar de forma que associe o tempo e o local correto de um evento futuro.

Esse tipo de desempenho pode simplesmente estar relacionado ao arrastamento do ritmo circadiano do animal (ASCHOFF, 1989; BEUGNON *et al.*, 1995). Essa sincronização ocorre devido aos estímulos periódicos do ambiente, o que indica que o ritmo não é controlado por fatores externos sendo, então, gerado de forma endógena (ASCHOFF, 1989). Um estudo realizado com abelhas *Trigona fulviventris* treinadas em receber alimento em horário e local específico, concluiu que elas são capazes de aprender o local e o horário correto em que estavam sendo alimentadas (MURPHY e BREED, 2008).

Em uma revisão, Fourcassié *et al.* (1999) verificaram que os primeiros experimentos envolvendo memória espaço-temporal foram realizados com abelhas. Elas tiveram um bom desempenho e foram capazes de associar o local com diferentes

horários do dia. Quando fazem parte de um grupo, os indivíduos podem sincronizar suas tarefas com as dos outros membros. Experimentos com formigas mostraram que espécies neotropicais também podem aprender quando e onde o néctar está disponível, porém isso não ocorreu com espécies de regiões temperadas. Segundo Fourcassié *et al.* (1999), e Schatz *et al.* (1999) e Murphy e Breed (2008) essa diferença pode estar relacionada à dieta do animal, na qual o alimento tem ou não uma produção regular no ambiente.

Schatz *et al.* (1994) realizaram um experimento com formigas *Ectatomma ruidum* e forneceram mel por 1h em lugares e horários diferentes por 21 dias seguidos. No 15º dia foi constatado uma preferência em visitar o local e horário correto. No 22º dia, o mel não foi fornecido e as visitas foram realizadas, novamente, nos locais e nos horários corretos preferencialmente. Schatz *et al.* (1999) testaram a mesma espécie de formigas no campo, com 2 pontos de alimentação, e no laboratório, com 3 pontos de alimentação, e para ambos foi colocado mel por 1h em horários diferentes. As operárias foram marcadas e observadas a cada 5 minutos no campo e a cada 15 minutos no laboratório, em intervalo de tempo determinado do dia.

O mel não foi disponibilizado no 12º e 15º dia, porém os pesquisadores verificaram que as formigas marcadas começaram a visitar o local apropriado 30 minutos antes do horário. Isso foi interpretado não como imprecisão do tempo, e sim prevenção contra competidores do alimento. As formigas *E. ruidum* também estimaram o tempo de duração da recompensa por estarem no local por pelo menos 1h. A ausência do mel aumentou a duração da viagem indicando que elas preferem permanecer no local correto do que procurar outro local com comida (SCHATZ *et al.*, 1999). Para Cammaerts e Cammaerts (2017) a hipótese é que na natureza, quando o alimento começa a ficar escasso, as formigas esperam encontrar outro recurso baseado na sua experiência anterior. Esse comportamento permite encontrá-lo com mais rapidez.

Algumas formigas são as primeiras em resolver problemas complexos tendo um repertório comportamental variado e mais agilidade do que os outros membros da colônia (REZNIKOVA e NOVGORODOVA, 1998; REZNIKOVA, 2007). Uma suposta predisposição para inovar pode estar relacionada com alguma característica genética. Se ocorre uma modificação no ambiente várias adaptações no comportamento destas formigas são testadas (REZNIKOVA, 2007). As formigas são suficientemente flexíveis

para se adaptarem às modificações do ambiente, que podem ocorrer rápida ou progressivamente (FOURCASSIÉ *et al.*, 1999).

1.6 Considerações Finais

Tomados em conjunto, todos os aspectos tratados aqui deixam claro que seria esperado que uma organização coletiva, como a observada nas trilhas de forrageamento, também envolvesse uma estruturação temporal. Isso tanto por conta da possibilidade de adaptação das colônias de formigas, caracterizadas como um sistema complexo, quanto por conta de ser observado que existem espécies de animais com alguma determinação temporal da busca de fontes alimentares e, mais importante, porque é descrito que há um padrão circadiano de atividade na trilha, o que pode demonstrar uma possível capacidade de resposta temporal das formigas.

Com todo esse potencial que as formigas possuem de ajustar seu nível de atividade conforme o estímulo do ambiente, pela memória espacial, pela ritmicidade e pela memória temporal, enfim, pela capacidade de aprenderem novas tarefas, a justificativa do estudo é verificar se colônias de formigas cortadeiras *Acromyrmex* sp. são capazes de se antecipar a ocorrência de um alimento que é disponibilizado sempre no mesmo local e no mesmo horário.

II. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar se as colônias de formigas *Acromyrmex* sp. são capazes de aprender o local e o horário de apresentação da sacarose e se antecipar à sua apresentação.

Objetivos Específicos

1. Analisar o efeito atrativo do alimento selecionado.

Para que as formigas se antecipem à sacarose é necessário que haja o interesse por esse estímulo. Para caracterizar se tal efeito existe foi avaliado se, ao longo dos dias de experimento, durante o horário em que a sacarose estava na sua bandeja correspondente (horário da sacarose), o número de indivíduos aumenta na trilha da sacarose.

2. Analisar os padrões de exploração e forrageamento.

Verificar a diferença do fluxo de indivíduos entre as trilhas de forrageamento durante o horário controle 1 e durante o horário controle 2 para observar o efeito anterior e posterior da sacarose no forrageamento das formigas.

3. Analisar o componente espacial do comportamento antecipatório.

Verificar se houve aprendizado espacial das colônias através da diferença do fluxo de formigas entre as trilhas de forrageamento no intervalo de tempo anterior à apresentação da sacarose (horário de antecipação) ao longo dos dias de treinamento.

4. Analisar o componente espaço-temporal do comportamento antecipatório.

Para avaliar se houve aprendizado temporal das colônias foi realizada a análise dos minutos anteriores à apresentação da sacarose, comparando a diferença do fluxo de

indivíduos entre as trilhas de forrageamento no mesmo intervalo de tempo. Como o aprendizado ocorre através do treinamento, esse tipo de análise deve levar em consideração o efeito das semanas de experimento.

5. Avaliar o papel do comportamento individual nos padrões coletivos

Quantificar o número de formigas marcadas nas bandejas de forrageamento. Para tal, verificar se existe uma preferência pelas bandejas de forrageamento ou se houve aprendizado do local e do horário em era colocada a sacarose durante o horário de antecipação e o horário da sacarose.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Para o presente estudo foram utilizadas 8 colônias de formigas do gênero *Acromyrmex sp* (Hymenoptera: Formicidae) de mais de 12 meses de idade mantidas no biotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP) em condições controladas de temperatura (25°C), umidade relativa do ar (70%) e fotoperíodo LD 12:12 horas.

Aclimação

Antes do início do experimento cada colônia foi mantida, para aclimação, por 5 dias no arranjo experimental descrito, quando as formigas podiam explorar livremente o novo ambiente.

3.2 Arranjo Experimental

Para o experimento foram utilizadas três bandejas (Figura 1). Uma bandeja central (33 x 60 cm) onde foi colocada a colônia, disposta entre dois e três recipientes de 600 ml, totalizando cerca de 1800 ml de fungo originário da colônia. A esta bandeja central outras duas bandejas de forrageamento (30 x 36 cm) foram conectadas, uma de cada lado da bandeja central através de pontes de madeira. Foram instaladas duas câmeras Logitech C920 Pro Full HD 1080p 15 MP conectadas a um computador para gravar a movimentação das formigas nas pontes. A ponte conectada a bandeja controle foi chamada de Trilha Controle (TC) e outra conectada com a bandeja onde foi acomodado o alimento, Trilha da Sacarose (TS).

Figura 3: Representação do arranjo experimental.

Procedimento experimental

Durante todo o experimento as formigas foram alimentadas *ad libitum* com folhas de *Acalipha* sp e aveia na bandeja central. Nesta fase foi utilizado o programa para gravação das imagens iSpy, no qual foi programado os dias (todos os dias da semana), o tempo de duração de cada vídeo (5 minutos) e os horários pré-estabelecidos em que as filmagens aconteceram:

- horário controle 1 (HC1) das 10h às 11h;
- horário de antecipação (HA) das 11h30 às 12h;
- horário da sacarose (HS) das 12h às 13h; e
- horário controle 2 (HC2) das 14h às 15h (Figura 4).

Figura 4: Escala do tempo com os horários de gravação dos vídeos nas trilhas de forrageamento. Legenda: TC – Trilha Controle, TS – Trilha da Sacarose, HC1 – Horário Controle 1, HA – Horário de Antecipação, HS – Horário da Sacarose, HC2 – Horário Controle 2.

O experimento teve duração de 22 dias consecutivos. Nestes dias estavam ocorrendo as gravações dos vídeos através do iSpy, com as programações já citadas acima. Durante 21 dias seguidos, foi colocado em uma placa de vidro limpa (8 cm x 4 cm) aproximadamente 1,5 ml de sacarose 0,6M às 12h na bandeja para sacarose. Ao retirar a sacarose, às 13h, outra placa limpa era colocada no lugar. As folhas de *Acalipha* sp. foram colocadas na bandeja central diariamente após a retirada da sacarose. No 22º dia não foi fornecida a sacarose.

3.3 Contagem do Fluxo de Indivíduos

Os vídeos gravados nos dois pontos de mensuração (TC e TS) foram analisados por um software de contagem automática de fluxo dos animais desenvolvido no próprio laboratório por Marcelo Arruda Fiuza de Toledo do Laboratório Ciência da Cognição (LabCog) do Instituto de Biociências da USP.

3.4 Marcação das formigas

Foi realizada uma marcação dos indivíduos para observar o comportamento individual das formigas. No 21º dia, os insetos foram marcadas com caneta à base de óleo. Aquelas que estavam na bandeja controle foram coloridas de dourado e as da bandeja para sacarose foram marcadas com prateado. As marcações foram feitas entre 11h40 e 12h, referente ao horário da antecipação, na região do abdômen; e entre 12h10 e 13h, referente ao horário da sacarose, na região do tórax. Assim, as formigas que foram coloridas formaram 4 grupos distintos de marcação (Tabela 1).

No 22º dia não foi fornecida a sacarose e foi realizada a contagem manual das formigas marcadas no dia anterior que estavam nas bandejas de forrageamento no horário de antecipação e no horário da sacarose a cada 15 minutos.

	Bandeja Controle	Bandeja para sacarose
11h40-12h	Abdômen / cor dourado <u>GRUPO 1</u>	Abdômen / cor prata <u>GRUPO 3</u>
12h10-13h	Tórax / cor dourado <u>GRUPO 2</u>	Tórax / cor prata <u>GRUPO 4</u>

Tabela 1: Esquema de marcação das formigas nas bandejas de forrageamento.

3.5 Análise dos Dados

Os dados brutos gerados na contagem automática foram organizados para realizar o teste de normalidade no pacote estatístico SPSS. Foram utilizados os Testes Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk. Uma vez que os dados não passaram no teste de normalidade, a análise estatística foi realizada pelo Teste de Friedman com o pacote de interface gráfica do RStudio versão 1.2.1335. Os gráficos foram elaborados pelo próprio RStudio e pelo programa Microsoft Office Excel.

O Teste de Friedman foi realizado com a média do fluxo das colônias e com intervalos de tempo de 10 minutos. Por fim, foram comparadas a diferença do fluxo das formigas entre as trilhas de forrageamento, entre os dias de experimento, entre os horários estabelecidos e entre os minutos. Para a análise dos dias, foi considerado os 21 dias e também a divisão dos 21 dias em: 1° semana, 2° semana e 3° semana.

Para a análise da marcação das formigas foi realizada a contagem total das 8 colônias de formigas que foram observadas no 22° dia em cada bandeja de forrageamento. Para cada grupo de formigas marcadas foi realizada a análise da distribuição binomial, com significância de $p < 0,05$ tanto no horário referente à antecipação e quanto no horário referente à sacarose.

IV. RESULTADOS

4.1 Visão Global do Fluxo de Formigas

A presença da sacarose no arranjo experimental causou mudanças no forrageamento das colônias de *Acromyrmex* sp. Na Figura 5, é possível observar a média do fluxo de formigas de todas as colônias para todos os dias e todas as horas a cada 10 minutos, em cada trilha e em cada horário estabelecido.

Figura 5: Fluxo das formigas nas trilhas nos 22 dias de experimento no horário controle 1 (HC1), no horário de antecipação (HA), no horário da sacarose (HS) e no horário controle 2 (HC2).

Para verificar esse efeito global da sacarose nas colônias foram feitas análises do fluxo de formigas entre as trilhas de forrageamento no horário controle 1 (HC1), no horário de antecipação (HA), no horário da sacarose (HS) e no horário controle 2 (HC2). No HS é possível observar que existe uma grande diferença no fluxo de formigas entre as duas trilhas, sendo maior na trilha da sacarose (TS).

Também é possível notar que o número de indivíduos é significativamente maior nesta mesma trilha no HC2, horário após a sacarose ser retirada. No HA ocorre diferença significativa entre as trilhas somente na terceira semana. No HC1 não foi verificada diferença no número de indivíduos entre as trilhas. Estas análises aparentes entre as trilhas e os horários serão tratadas adiante em detalhes.

4.1.1 Atividade de Forrageamento na Trilha da Sacarose

Através dos dados analisados foi verificada a diferença no fluxo das formigas na trilha da sacarose entre os horários estabelecidos. No decorrer dos 21 dias, observou-se que houve aumento significativo do fluxo das formigas no HS ($p < 0,05$), horário que teve maior fluxo em comparação aos demais. Também o horário HC2 foi diferente de todos os demais ($p < 0,05$). Os horários HC1 e HA não diferiram entre si (Figura 6).

Figura 6: Fluxo de indivíduos na TS entre os horários estabelecidos entre os dias 1 a 21.

4.1.2 Atividade de Forrageamento na Trilha Controle

A mesma análise do item anterior foi realizada para a trilha controle. Foi verificado que houve queda significativa no fluxo das formigas no HS e no HC2 entre os dias 1 a 21 em comparação com HC1 e HA ($p < 0,05$). A diminuição no forrageamento nesses horários parece ser consequência dos resultados verificados no item anterior. Os horários HC1 e HA não diferiram entre si (Figura 7).

Figura 7: Fluxo de indivíduos nos horários estabelecidos entre os dias 1 a 21 na TC.

4.2 Análise do Horário da Sacarose

Foram realizadas três análises diferentes para verificar o comportamento das colônias durante o experimento: a diferença do fluxo de formigas entre as trilhas de forrageamento; a diferença do fluxo de formigas entre as semanas para a TC e também para a TS. As mesmas análises foram aplicadas para HC1, HC2 e HA, como será verificado mais adiante nos próximos itens.

Em relação ao HS, foi verificado anteriormente que existe diferença significativa no fluxo dos indivíduos entre as trilhas de forrageamento. A Figura 8 mostra que essa diferença é grande no decorrer das 3 semanas, o que significa que as formigas responderam positivamente à sacarose devido ao maior número de indivíduos na TS.

Ao observar o fluxo das formigas em cada trilha de forrageamento no HS foi analisado que na TC e na TS não houve diferença entre as semanas. Embora a quantidade de indivíduos seja baixa na TC e alta na TS.

Figura 8: Fluxo de formigas entre as trilhas no HS.

4.3 Análise dos Horários Controles (HC1 e HC2)

Conforme verificado previamente, na análise do HC1 não houve diferença de fluxo das formigas entre as trilhas de forrageamento. A análise realizada para cada trilha também não teve diferença significativa entre as semanas de experimento (Figura 9).

Figura 9: Fluxo de formigas entre as trilhas no HC1.

No HC2, foi observado um fluxo latente pós-sacarose na TS, ocasionando uma diferença significativa entre as trilhas de forrageamento nos dias de experimento em que foi colocada o açúcar. Na TC não houve diferença significativa ao longo das semanas. Na TS houve diferença significativa no fluxo das formigas somente na 3ª semana (Figura 10).

Figura 10: Fluxo de formigas entre as trilhas no HC2.

4.4 Resposta Antecipatória

Conforme foi analisado previamente em relação ao HA, observou-se que existe diferença significativa no fluxo de formigas entre as trilhas somente na 3ª semana. Ao analisar as trilhas separadamente, não foi verificada diferença significativa entre as semanas na TC. Contudo, é possível observar na TS um aumento gradativo no fluxo de indivíduos nas semanas em que foram colocadas a sacarose (Figura 11). Assim, aparece uma resposta no fluxo na 3ª semana, com fluxo distinto na comparação entre TC e TS ($p < 0,05$).

Figura 11: Fluxo das formigas entre as trilhas no HA.

4.4.1 Análise dos Minutos Durante HA

A análise dos minutos permite verificar que, durante o HA, a diferença entre o fluxo dos indivíduos na TC e na TS variou. Ao longo dos dias 1 a 21, houve diferença significativa de 10 minutos antes da sacarose ser acomodada na bandeja correspondente, 11h50 (Figura 12A). Na 1° semana não foi observada essa diferença. Na 2° semana houve diferença significativa às 11h50 e na 3° semana às 11h40 e às 11h50 (Figura 12). Estes dados indicam uma mudança progressiva no comportamento das colônias de *Acromyrmex* sp. com diferenças sempre para $p < 0,05$

Figura 52: Fluxo de indivíduos no HA: A) entre os dias 1 a 21, B) na 1ª semana, C) na 2ª semana e D) na 3ª semana.

Também foi analisado o aprendizado das formigas nas semanas para cada intervalo de 10 minutos do HA, considerando apenas a TS. No intervalo das 11h30 até 11h39 não houve diferença entre as semanas, das 11h40 até 11h49 e das 11h50 até 11h59 houve aumento gradativo do fluxo de formigas (Figura 13 A, 13 B e 13 C, respectivamente). A mesma análise realizada para a TC nos três intervalos de tempo não deu diferença significativa entre as semanas.

Figura 63: Fluxo de indivíduos entre as semanas no HA às: A) 11h30, B) 11h40 e C) 11h50.

4.4.2 Análise dos Minutos Durante HS

No HS, houve diferença significativa entre as trilhas no decorrer das semanas como foi verificado anteriormente. Ao analisar os minutos em cada semana, o mesmo resultado é observado, mas houve uma variação no fluxo das formigas nas três semanas às 12h00, horário em que foi colocada a sacarose (Figura 14 A, 14 B e 14 C). Neste horário, houve aumento significativo no fluxo da TS ao comparar a 1ª e a 2ª semana, e depois a quantidade de indivíduos se estabiliza progressivamente na 3ª semana (Figura 14 D) e nos horários de 12h10 (Figura 14 E) e 12h20 (Figura 14 F).

Figura 74: Fluxo de indivíduos no HS na: A) 1ª semana, B) 2ª semana, C) 3ª semana, D) TS das 12h00 até 12h09, E) TS das 12h10 até 12h19, e F) TS das 12h20 até 12h29.

4.5 Análise do Dia Sem a Disponibilização da Sacarose (22º Dia)

No 22º dia de experimento, dia em que as colônias não receberam a sacarose, foi verificado que houve diferença significativa entre as trilhas no HS e HC2, sendo observada uma preferência pela TS (Figura 15).

Figura 15: Fluxo dos indivíduos nas trilhas no 22º dia de experimento.

Foi realizada a análise dos minutos durante HA no dia sem a sacarose e foi verificado que houve aumento significativo na TS, 10 minutos antes de ser colocada a sacarose, às 11h50 (Figura 16).

Figura 16: Fluxo dos indivíduos durante o horário da antecipação no 22º dia de experimento.

Como continuação do comportamento das formigas observado no HA, foi realizada a mesma análise para o HS no 22º dia. Foi verificado que o fluxo dos

indivíduos teve diferença significativa entre as trilhas somente às 12h10, 12h20 e 12h30 (Figura 17).

Figura 17: Fluxo dos indivíduos durante o HS no 22º dia de experimento.

4.6 Análise das formigas marcadas

A quantidade de formigas marcadas no 21º dia de experimento para verificar o comportamento individual pode ser visualizada na Tabela 2. O tempo de marcação para cada bandeja foi diferente, pois muitas vezes a bandeja controle ficava vazia, enquanto as formigas que estavam na bandeja para sacarose continuavam sendo marcadas. Elas foram observadas no 22º dia e separadas em 4 grupos conforme o padrão de marcação que pode ser verificado na Tabela 1.

Horário da marcação	Número de formigas marcadas	
	Bandeja Controle	Bandeja para Sacarose
11h40-12h	50	115
12h10-13h	40	222

Tabela 2: Quantidade de formigas marcadas nas bandejas de forrageamento.

Na Figura 18, os dados apresentam os quatro grupos que foram observados nas bandejas durante HA e HS. O Grupo 1, que foi marcado na bandeja controle, apresentou diferença significativa no número de formigas durante o HA e o HS tendo preferência por essa bandeja (teste binomial com probabilidade esperada de sucesso de 0,50: HA: 12/17, $Z=9.62$, $p=0.047$; HS: 22/33, $Z=7.66$, $p=0.022$). Os indivíduos do Grupo 3 e do Grupo 4, foram observados em maior número na mesma bandeja em que foram marcados, bandeja para sacarose, também em ambos os horários em que foi realizada a coleta dos dados (GRUPO 3: HA: 24/38, $Z=5.98$, $p=0.035$; HS: 46/75, $Z=5.13$, $p=0.013$; GRUPO 4: HA: 27/44, $Z=5.14$, $p<0.04$; HS: 50/78, $Z=6.43$, $p<0.005$).

Figura 88: Quantidade de formigas observadas nas bandejas no 22º dia de experimento.

V. DISCUSSÃO

As análises realizadas através da contagem dos insetos que iam em direção às bandejas por meio das trilhas de forrageamento mostrou que as colônias de formigas *Acromyrmex* sp. são capazes de responder à presença da sacarose e, mais ainda, antecipá-la no local exato de sua apresentação. Houve aprendizado tanto para responder à sacarose quando apresentada por 21 dias consecutivos, seguida de uma fase de declínio do fluxo de indivíduos após ela ser retirada, quanto para se antecipar a ela.

5.1 Forrageamento em *Acromyrmex*

Pode-se observar facilmente o forrageamento em *Lasius niger* colocando um prato de solução de açúcar nas proximidades de um ninho. Depois de algum tempo, uma forrageadora descobrirá o açúcar e logo depois, através de um processo de recrutamento, várias forrageadoras aparecerão na fonte de alimento. Se traçarmos o número de formigas no açúcar em função do tempo, geralmente obtemos uma curva logística que finalmente atinge um platô. (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; TRANIELLO e ROBSON, 1995 *apud* CAMAZINE *et al.*, 2001, p. 217)

Assim, como descrito acima, a presença da sacarose no arranjo experimental desencadeou este comportamento nas colônias de *Acromyrmex* e fez com que o número de formigas na trilha da sacarose durante o HS se elevasse consideravelmente. O efeito desse comportamento nas colônias durante o forrageio pode ser claramente observado na Figura 5. Enquanto a frequência dos indivíduos nos horários anteriores ao fornecimento do açúcar, HC1 e o HA, se mantém mais baixos e aparentemente similares entre TS e TC (suplantando em muito mesmo o observado comportamento antecipatório em TS); a frequência dos indivíduos no horário com a presença da sacarose, HS, e no horário após a retirada da sacarose, HC2, é enormemente diferente entre TS e TC com o fluxo voltado significativamente para a trilha que dava acesso à sacarose.

5.1.1 Efeito da Sacarose nas Trilhas de Forrageamento

Ao verificar o efeito da sacarose na TS no Figura 6, é possível observar que houve o processo de recrutamento durante a presença do açúcar (HS) devido ao fluxo elevado de indivíduos. O recrutamento envolve o processo de *feedback* positivo que causa essa amplificação do número de formigas (CAMAZINE *et al.*, 2001). Em seguida, a retirada da sacarose causou a queda no fluxo de formigas que pode ser acompanhada no HC2. A ausência do alimento no arranjo experimental deu início ao processo de *feedback* negativo no forrageio (BONABEAU *et al.*, 1997). No entanto, é nítido o efeito de manutenção de um fluxo elevado em HC2, ou seja, apesar dos efeitos esperados de queda, dada a ausência do estímulo, há um efeito inercial importante em HC2. Pelo bom desempenho na busca pela sacarose, TC apresentou queda significativa no número de formigas que se deslocavam em direção à bandeja controle durante HS e durante HC2 (Figura 7), pois a maior quantidade de formigas ficou direcionada à bandeja da sacarose nas 3 semanas seguidas de experimento.

5.1.2 O Efeito Indutor de Antecipação da Sacarose em HS

Como foi verificado, as formigas *Acromyrmex* responderam prontamente à sacarose. Esse comportamento é claramente observado durante o HS ao comparar o fluxo das formigas entre as trilhas de forrageamento (Figura 8). Enquanto a TC manteve níveis baixos de formigas indo forragear na bandeja controle, a TS teve um intenso fluxo de indivíduos transitando em direção a bandeja para sacarose nos 21 dias. Um fator relevante foi verificar que as colônias de *Acromyrmex* responderam positivamente ao período do dia em que foi fornecido o alimento.

Embora tenha sido verificada maior atividade de forrageamento noturno em *Atta cephalotes* (CHERRETT, 1968) e em *Atta sexdens rubropilosa* (TOLEDO, 2013; CONSTANTINO, 2017), que também são formigas cortadeiras, sabe-se que as formigas se adaptam para forragear a noite no verão devido à termorregulação, e no inverno elas se ajustam para sair do ninho durante o dia (HOLLDÖBLER e WILSON, 2011). O ajuste das atividades conforme o estímulo recebido (GORDON, 1996), neste caso a sacarose, foi possível porque as formigas foram mantidas em condições controladas de temperatura e umidade do ar.

Isso corrobora com o estudo realizado com espécies de *Acromyrmex* de que o forrageamento está relacionado com as condições ambientais, como a temperatura e a umidade, sendo por isso mais ativas durante a primavera e o verão e por não forragearem abaixo de 10-11° C (NICKELE *et al.*, 2016). As formigas tiveram, portanto, um comportamento flexível em relação ao horário em que foi realizado o experimento. Assim, foi possível observar que a sacarose atuou como um *zeitgeber* permitindo que as formigas sincronizassem suas atividades aos eventos cíclicos do ambiente (ASCHOFF, 1989), no caso a sacarose sempre no mesmo horário. Um possível arrastamento pode ter ocorrido nos ritmos endógenos das formigas para garantir o sucesso no forrageamento das colônias durante HS.

5.1.3 Declínio do Forrageamento em HC2

Uma hora após o alimento ser retirado, ainda é possível observar um fluxo considerável na TS durante o HC2 (Figura 10). Neste horário, o número de forrageadoras é menor em relação à HS, isto porque assim que a sacarose é retirada o feromônio que estava estimulando a ida para a TS para de ser depositado e começa a evaporar e a trilha vai desaparecendo (JAFFE *et al.*, 2012). Nesta etapa o processo de *feedback* negativo permite que o sistema se “estabilize” novamente. Esta situação pode ocorrer no forrageamento quando ocorre a exaustão do alimento (BONABEAU *et al.*, 1997).

As formigas continuam visitando o local apropriado por um tempo depois que o período de disponibilidade do alimento se encerra (SCHATZ *et al.*, 1999), pois a trilha estabelecida por mais indivíduos perdura mais do que a estabelecida por menos indivíduos (EVISON *et al.*, 2008). Isso explica, o motivo do fluxo ainda ser relativamente alto em HC2. Além disso, acredita-se que alguma mudança pode ter ocorrido na organização das colônias, pois o número de indivíduos aumentou significativamente na 3ª semana na TS, mas não TC.

5.2 Comportamento Antecipatório à Sacarose

A capacidade de utilizar tanto a memória espacial quanto a memória temporal permite que o desempenho de um organismo exposto a um desafio seja melhor e com melhores chances de preparação. A decisão dos indivíduos de estarem preparados para executar o recrutamento envolve maior garantia e maior quantidade de coleta de

alimento proporcionando mais recursos para a sobrevivência para a colônia. Por isso, a memória das formigas foi analisada através do aprendizado espaço-temporal.

5.2.1 Aprendizado Espacial

A presença da sacarose em um horário fixo no arranjo experimental provocou uma mudança no comportamento das colônias no horário antecedente ao que estavam recebendo o alimento, o HA. Essa mudança foi observada ao comparar o fluxo de formigas entre as trilhas de forrageamento neste intervalo de tempo. Ao verificar que na 3ª semana houve uma diferença significativa no fluxo das trilhas, observa-se que as formigas tiveram preferência pela TS (Figura 11). Além disso, houve aumento gradativo de indivíduos na TS no decorrer das 3 semanas, o que não ocorreu na TC. Esses dados podem ser a causa do aumento do fluxo na 3ª semana na TS em HC2, visto anteriormente. As formigas ajustaram seu nível de atividade devido ao estímulo do ambiente (GORDON, 1996), o que indica que as colônias aprenderam o local em que o açúcar era disponibilizado.

A preferência e o aumento gradativo do fluxo na trilha que levava à sacarose mostra que as formigas se adaptaram à disponibilização do açúcar. Se as unidades se adaptam às mudanças do ambiente, o sistema também pode ter essa capacidade de adaptação (PAGE, 2011). Foi justamente isso que foi observado nesse experimento, as colônias se adaptaram ao local em que estavam recebendo a sacarose. Os principais meios de navegação, a integração de caminhos e os pontos de referência (WEHNER et al., 1990; COLLETT, 1992) do próprio arranjo experimental, possivelmente foram utilizados para as formigas se orientarem até a bandeja da sacarose.

5.2.2 Aprendizado Espaço-Temporal

A análise dos minutos também contribui com o raciocínio de que as formigas aprenderam, neste caso tanto o local quanto o horário, ao mostrar uma diferença significativa entre as trilhas às 11h50 no decorrer dos 21 dias, ou seja, houve uma antecipação de 10 minutos (Figura 12 A). O ideia do arrastamento, sincronização dos ritmos endógenos aos eventos cíclicos do ambiente (ASCHOFF, 1989), provavelmente pode ser aplicada neste caso, como comentado no item 5.1.2 sobre o horário do experimento. Essa análise também mostra que o aprendizado das formigas

ocorreu de forma gradativa ao ser verificada uma antecipação de 10 minutos na 2ª semana e de 20 minutos na 3ª semana (Figura 12 C e 12 D, respectivamente).

Observa-se esse aprendizado e/ou recrutamento das formigas devido ao aumento significativo de indivíduos a cada semana na TS a partir de 11h40 (Figura 13 B e 13 C), ou seja, 20 minutos de antecipação corroborando com a análise acima. O aprendizado gradativo pode ser observado até 12h19, com o aumento significativo entre a 1ª e a 2ª semana das 12h00 até 12h09 e com a diferença entre os quartis entre as outras semanas (Figura 14 D e 14 E, respectivamente). Após 12h20 o fluxo de indivíduos começa a se estabilizar devido à formação da trilha para a coleta da sacarose (Figura 14 F).

O aumento do fluxo conforme o horário da apresentação da sacarose se aproxima (HA) pode estar envolvido com o recrutamento para antecipação ou mais indivíduos aprenderam a tarefa e passaram a se antecipar também ou ambos (Figura 19). Por fazerem parte de uma colônia, outras formigas podem ter aprendido a tarefa sincronizando as suas atividades com as formigas que já haviam aprendido (FOURCASSIÉ *et al.*, 1999), pois o que cada formiga faz afeta as outras (PAGE, 2011). A dinâmica da colônia influencia no comportamento do indivíduo (FEINERMAN e KORMAN, 2017; FRANK e LINSENMAIR, 2017) devido aos padrões de interações formados durante os dias em que estímulo foi apresentado (GORDON, 2018), o que justifica o aprendizado espaço-temporal gradativo.

Figura 99: Etapas de forrageamento de formiga sem e com aprendizado espaço-temporal. Adaptado de Beshers & Fewell, 2001.

A etapa da preparação é importante para que mais indivíduos se mobilizem, podendo recrutar mais indivíduos que também possam estar preparados para interagir entre si e gerar uma mudança no sistema das colônias com a finalidade de coletar o alimento. Sem a antecipação essa preparação não ocorreria e as etapas seguintes provavelmente demorariam mais tempo para acontecer, minimizando ou impedindo a realização da coleta. Essa plasticidade comportamental dos indivíduos e da colônia permitiu uma visita antecipatória do local.

O 22º dia, dia sem sacarose, também aponta que houve aprendizado espaço-temporal da tarefa. Foi verificada diferença significativa no fluxo de formigas entre as trilhas durante HS e HC2 (Figura 15). A opção de escolha pela TS, e não pela TC, sinaliza que elas estavam aguardando pela sacarose no tempo e no local esperado. De acordo com Schatz *et al.* (1999), a ausência completa ou parcial da recompensa está associada com um aumento significativo do tempo da viagem, sugerindo que as formigas preferem permanecer no local correto mesmo sem a recompensa ao invés de se locomover para outro local. As formigas também foram capazes de estimar o tempo de duração da recompensa devido ao fluxo ser maior na TS durante HS, o que também foi observado por Schatz *et al.*, (1999).

A análise dos minutos durante o HA no 22º dia mostra que houve antecipação de 10 minutos (Figura 16). No HS, o fluxo das formigas foi maior na TS em todos os intervalos de 10 minutos, porém foi significativo somente entre 12h10 e 12h30 (Figura 17). O fato das formigas terem se antecipado e decidirem ficar no local mesmo sem o alimento mostra que elas sacrificam seu tempo e sua energia para o bem da colônia, assim como foi verificado por Roces e Núñez (1993). Houve, portanto, um aprendizado espaço-temporal, ou seja, uma antecipação que ocorre quando o animal associa o tempo e o local de um evento futuro (BEUGNON *et al.*, 1995). A ritmicidade e a memória espaço-temporal foram importantes para esse aprendizado. Até porque os animais utilizam a memória para sobreviver e melhorar suas vidas (REZNIKOVA, 2007).

Na natureza, a antecipação indica prevenção contra competidores do alimento (SCHATZ *et al.*, 1999; ROCES, 2002) maiores chances de preparação (CIPOLLANETO *et al.*, 1988), agilidade no recrutamento (ROCES, 2002) e maior garantia de sobrevivência da colônia (REZNIKOVA, 2007). Testes envolvendo estudos de cronobiologia vem sendo realizados para descobrir como ocorre o processo da atividade antecipatória ao alimento (do inglês: *food anticipatory activity* ou FAA) no

organismo. Foi mencionada a hipótese de que um horário regular de alimentação poderia contribuir em melhorias na memória e no aprendizado, além de reduzir impactos fisiológicos e cognitivos negativos em humanos (WALL *et al.*, 2019).

5.2.3 Considerações do Aprendizado Espaço-Temporal na Colônia

Foi verificado que a quantidade de formigas que se antecipou à apresentação da sacarose (HA) foi baixo (Figuras 12, 13 e 16) quando comparado com o observado em HS. Como as escoteiras controlam o comportamento da colônia (FRANK e LINSÉNMAIR, 2017), possivelmente, essa atividade está relacionada à elas. Enquanto as outras castas estão realizando suas atividades dentro ou próximo do ninho, as escoteiras saem do ninho para forragear e cumprir seu papel. A divisão de trabalho combinada com a cooperação é uma grande vantagem para os insetos sociais (WILSON, 1980) e o aumento do grau de especialização das operárias contribui para a organização da colônia (WILSON, 2000). Através de alguns indivíduos podem ser expressados a memória e o aprendizado (MORLEY, 1958) da colônia, provavelmente devido a maior agilidade, variedade de comportamento (REZNIKOVA e NOVGORODOVA, 1998) e capacidade de adaptação (FOURCASSIÉ *et al.*, 1999; GORDON, 2002; REZNIKOVA, 2007) das formigas.

Além disso, a coleta da sacarose consome tempo e energia (CARMO, 2014), não sendo necessário uma grande quantidade de formigas esperando a sacarose ser colocada na bandeja. Basta esperar que sejam recrutadas. Então, um número mínimo de formigas devem se apresentar no local e horário corretos para se prepararem. Essa hipótese pode explicar a diferença do fluxo entre as trilhas durante HS no 22º dia (Figura 17). Houve, então, um ajuste das atividades das operárias para forragear onde e quando a sacarose era disponibilizada. Acredita-se que, em menor escala, essas unidades operacionais interagiram entre si permitindo uma mudança na característica do sistema (DENEUBOURG *et al.*, 1999; GORDON, 2018) fazendo com que novas propriedades sejam adquiridas através da auto-organização (CAMAZINE *et al.*, 2001).

5.2.4 Padrões Individuais

Foi verificado que as formigas forrageiam por caminhos estereotipados ao transitarem entre dois lugares conhecidos (COLLETT *et al.*, 1992). O teste da marcação das formigas corroborou com Collett e colaboradores (1992) ao mostrar que os indivíduos que foram marcados na bandeja controle e na bandeja para sacarose foram vistos significativamente nas suas bandejas correspondentes, durante o HA e o HS. Com exceção das formigas que foram marcadas na bandeja controle no horário referente ao HS (Figura 18). Mesmo que as atividades das colônias estejam voltadas para a bandeja da sacarose devido ao estímulo apresentado por 21 dias, a exploração da outra bandeja não foi abandonada totalmente. Havia operárias responsáveis por essa atividade, pois as mesmas formigas que foram marcadas na bandeja controle também foram avistadas nela, preferencialmente. Provavelmente para explorar mais recursos em outros lugares, estarem atentas à competição (GORDON, 2002).

VI CONCLUSÃO

Os dados coletados neste estudo mostraram que as colônias de formigas *Acromyrmex* sp. são capazes de antecipar a apresentação de sacarose, para as quais estas responderam positivamente durante todo o experimento. O grande número de formigas engajados no forrageamento ocasionou uma movimentação considerável, que perdurou mesmo depois da retirada da sacarose, indicando algum efeito inercial. Essa atuação permitiu que algumas formigas forrageadoras utilizassem sua memória espaço-temporal para sincronizar suas atividades com o desafio proposto no estudo. A eficácia no recrutamento permite maior eficiência para a formação da trilha de forrageamento e, como consequência, para a coleta do alimento. O ajuste das atividades dessas formigas viabilizou o aprendido espaço-temporal das colônias que foram capazes de aprender progressivamente a tarefa, em outras palavras, as unidades do sistema se adaptaram fazendo com que próprio sistema se adaptasse através da auto-organização. Foi gerado um novo padrão de atividades e a plasticidade comportamental foi importante para que a antecipação de 20 minutos das colônias pudesse acontecer. Também deve ser levado em consideração a divisão de trabalho, característica dos insetos eussociais, que provavelmente preveniu a perda de tempo e de energia da colônia como um todo no dia em que a sacarose não foi apresentada. Apenas uma pequena parcela de indivíduos ficaram à espera da sacarose. A existência das castas foi importante para esse dia. Mesmo com o foco do forrageamento ser na bandeja para sacarose, a bandeja controle não deixou de ser explorada totalmente mesmo nos horários anteriores e de apresentação do açúcar. Havia formigas responsáveis em explorar e vigiar a outra área enquanto grande parte da colônia ficava responsável pelas atividades que envolviam a coleta da sacarose. Se cada indivíduo exerce seu papel se adaptando aos desafios do ambiente em prol do sucesso da colônia, pode-se observar uma verdadeira sociedade.

REFERÊNCIAS

- ASCHOFF, J. Circadian temporal adaptation and the perception of time. **International Journal of Psychophysiology**, v. 7, n. 2-4, p. 121-123, 1989.
- BESHERS, S. N.; FEWELL, J. H. Models of division of labor in social insects. **Annual Review of Entomology**, v. 46, n. 1, p. 413–440, 2001.
- BEUGNON, G.; PASTERGUE-RUIZ, I.; SCHATZ, B.; LACHAUD, J. Cognitive approach of spatial and temporal information processing in insects. **Behavioural Processes**, v. 35, n. 1-3, p. 55-62, 1995.
- BOLLAZZI, M.; ROCES, F. Information needs at the beginning of foraging: grass-cutting ants trade off load size for a faster return to the nest. **Plos One**.V. v, n. 3. 2011.
- BONABEAU, E.; THERAULAZ, G.; DENEUBOURG, J. L.; ARON, S.; CAMAZINE, S. Self-organization in social insects. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, n. 5, p. 188-193, 1997.
- CAMAZINE, S.; DENEUBOURG, J.L.; FRANKS, N. R.; SNEYD, J.; THERAULAZ, G.; BONABEAU, E. **Self-Organization in Biological Systems**. Princeton University Press, New Jersey, 2001.
- CAMMAERTS, M.C.; CAMMAERTS, R. Spatial expectation of food location in na anto n basis of previous food locations (Hymenoptera, Formicidae). **Journal of Ethology**, v. 35, n. 1, p. 83-91, 2017.
- CARMO, Daniele Victoratti do. **Descrição da atividade de forrageamento em Atta sexdens rubropilosa**: transferência de informação e seleção de tarefas. 2014. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Geral) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- CHAMERON, S.; SCHATZ, B.; PASTERGUE-RUIZ, I.; BEUGNON, G.; COLLETT, T.S. The learning of a sequence of visual patterns by the ant *Cataglyphis cursor*. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B**, v. 265, p. 2309-2313, 1998.
- CHERRETT, J. M. The foraging behaviour of atta cephalotes I. **Journal of Animal Ecology**, v. 37, n. 2, p. 387-403, 1968.
- CIPOLLA-NETO, J.; MARQUES, M.; MENNA-BARRETO, L. S. **Introdução ao estudo da cronobiologia**. São Paulo: Ícone, 1988.
- COLLETT, T. S. Landm ark learning and guidance in insects. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B**, v. 337, p. 295-303, 1992.
- COLLLETT, T. S.; DILLMAN, E.; GIGER, A.; WEHNER, R. Visual landmarks and route following in desert ants. **Journal of comparative physiology A**, v. 170, p. 435-442, 1992.

CONSTANTINO, Pedro Brisola. **Ritmos de atividade coletiva e divisão de temporal de tarefas em formigas saúvas**. 2017. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Geral) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

CZACZKES, T. J.; GRÜTER, C.; ELLIS, L.; WOOD, E.; RATNIEKS, F. L.W. Ant foraging on complex trails: route learning and the role of trail pheromones in *Lasius niger*. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, p. 188-197, 2013.

CZACZKES, T. J.; GRÜTER, C.; JONES, S. M.; RATNIEKS, F. L.W. Uncovering the complexity of ant foraging trails. **Communicative & Integrative Biology**, v. 5, n. 1, p. 78-80, 2012.

DENEUBOURG, J. L.; CAMAZINE, S.; DETRAIN, C. Self-organization or individual complexity: a false dilemma or a true complementarity. **Information processing in social insects**. [S.l.]: Birkhäuser Verlag, Basel, p. 401-407, 1999.

DIEHL, E. Conhecendo os insetos sociais: cupins e formigas. **Revista do Instituto Humanitas Unisinos**, n. 205, 2006.

EVISON, S. E. F.; PETCHEY, O. L.; BECKERMAN, A. P.; RATNIEKS. Combined Use of Pheromone Trails and Visual Landmarks by the Common Garden Ant *Lasius niger*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 63, n. 2, p. 261–267, 2008.

FEINERMAN, O.; KORMAN, A. Individual versus collective cognition in social insects. **Journal of Experimental Biology**, v. 220, p. 73-82, 2017.

FORTI, L. C., CAMARGO, R. S., MATOS, C. A. O. DE, ANDRADE, A. P. P. DE; LOPES, J. F. Aloetismo em *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel (Hymenoptera, Formicidae), durante o forrageamento, cultivo do jardim de fungo e devolução dos materiais forrageados. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 1, p. 59-63, 2004.

FOURCASSIÉ, V. J. L.; SCHATZ, B.; BEUGNON, G. Temporal information in social insects. **Information processing in social insects**. [S.l.]: Birkhäuser Verlag, Basel, p. 261-275, 1999.

FRANK, E. T.; LINSSENMAIR, K. E. Individual versus collective decision making: optimal foraging in the group-hunting termite specialist *Megaponera analis*. **Animal Behaviour**, v. 130, p. 27-35, 2017.

FREAS, C. A.; SCHULTHEISS, P. How to Navigate in Different Environments and Situations: Lessons From Ants. **Frontiers in Psychology**, v. 9, n. 841, p. 1-7, 2018.

GARDINER, B. G. Linnaeus' Floral Clock. **The Linnean**, v. 3, n. 1, p. 26–29, 1987.

GELL-MANN, M. Plectics: The study of simplicity and complexity. **Europsychics News**, v. 33, n. 1, p. 17-20, 2002.

GIEBULTOWICZ, J.M. Molecular mechanism and cellular distribution of insect circadian clocks. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 769–793, 2000.

GOMIDES, C.H.F.; DELLA LUCIA, T.M.C.; ARAÚJO, F.S., MOREIRA, D.D.O. Velocidad de forrajeo y área foliar transportada por la hormiga *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). **Revista de Biología Tropical**, v. 45, n.4, p. 1663-1667, 1997.

GONÇALVES, C. R. O Gênero *Acromyrmex* no Brasil. **Studia Entomologica**, v.1, p. 113-180, 1961.

GORDON, D. M. **An ant colony has memories that its individual members don't have**. Aeon. [S.l.] 2018. Disponível em: <<https://aeon.co/ideas/an-ant-colony-has-memories-that-its-individual-members-dont-have>>. Acesso em: 23 jan. 2020.

GORDON, D. M. **Formigas em ação**: como se organiza uma sociedade de insetos. Rio de Janeiro: Jorge Zahar Ed., 2002.

GORDON, D. M. The organization of work in social insect colonies. **Nature**, v. 380, p. 121–124, 1996.

HARRISON, J. F.; FEWELL, J. H.; STILLER, T. M.; BREED, M. D. Effects of Experience on Use of Orientation Cues in the Giant Tropical Ant. **Animal Behaviour**, v. 37, n. 5, p. 869-871, 1989.

HEYLIGHEN, F. Building a Science of complexity. **Proceedings Annual Conference of the Cybernetics Society of London**, p. 1-22, 1988.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **Journey to the ants**. Library of Congress Catalogin in Publication Data. USA. 1994.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O.. **The Leafcutter Ants**. W. W. Norton & Company. New York. 2011.

JACKSON, D. E.; RATNIEKS, F. L. W. Communication in ants. **Current Biology**, v. 16, n.15, p. 570-574, 2006.

JAFFE, K.; HOWSE, P.E. The mass recruitment system of the leaf cutting ant, *Atta cephalotes* (L.) **Animal Behaviour**, v.27, n. 3, p. 930-939, 1979.

JAFFE, K.; ISSA, S.; SAINZ-BORGIO, C. Chemical Recruitmente for Foraging in Ants (Formicidae) and Termites (Isoptera): A Revealing Comparison. **Psyche**, p.1-11, 2012.

MAPA, 2016. **Revisão, análise e discussão sobre a viabilidade do uso das alternativas ao PFOS, seus sais e PFOSF, no controle das formigas cortadeiras *Atta* e *Acromyrmex* dentro de uma abordagem de Manejo Integrado de Pragas. 213p**". (Consultado em 03/10/2018: <http://chm.pops.int/TheConvention/POPsReviewCommittee/Meetings/POPRC11/POPRC11Followup/PFOSInfoRequest/tabid/4814/ItemId/5951/Default.aspx>)

MORLEY, D. W. **A evolução de uma sociedade de insetos**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1958.

MURPHY, C. M.; BREED, M. D. Time-place learning in a neotropical stingless bee, *Trigona fulviventris* Guérin (Hymenoptera: Apidae). **Journal of the Kansas entomological society**, v. 81, n. 1, p. 73-76, 2008.

NICKELE, M. A.; REIS, W. F.; PIE M. R., PENTEADO, S.R.C. Daily Foraging Activity of *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) Leaf-cutting Ants. **Sociobiology**, v. 63, n. 1, p. 645-650, 2016.

OSTER, G. F.; WILSON, E. O. **Caste and Ecology in the Social Insects**. New Jersey: Princeton University Press, 1978.

PAGE, S. E. **Diversity and complexity**. New Jersey: Princeton University Press, 2011.

REZNIKOVA, Z. **Animal Intelligence**. From individual to social cognition. Cambridge University Press. USA. 2007.

REZNIKOVA, Z. I.; NOVGORODOVA, T. A. The Importance of Individual and Social Experience for Interaction between Ants and Symbiotic Aphids. **Doklady Biological Sciences**, v. 359, p. 173–175, 1998.

RIBEIRO, P. L.; HELENE, A. F.; XAVIER, G.; NAVAS, C.; RIBEIRO, F. L. Ants can learn to forage on one-way trails. **Plos One**, v. 4, n. 4, p. e5024, 2009.

ROCES, F. Individual Complexity and Self-Organization in Foraging by Leaf-Cutting Ants. **Biological Bulletin**, v. 202, n. 3, p. 306-313, 2002.

ROCES, F.; NÚÑEZ, J. A. Information about food quality influences load-size selection in recruited leaf-cutting ants. **Animal Behaviour**, v. 45, n. 1, p. 135-14, 1993.

SCHATZ, B.; BEUGNON, G.; LACHAUD, J-P. Time-place learning by an invertebrate, the ant *Ectatomma ruidum* Roger. **Animal Behavior**, v. 48, p. 236-238, 1994.

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

TELLO-RAMOS, M. C.; HURLY, T.A.; HIGGOTT, C.; HEALY, S.D. Time–place learning in wild, free-living hummingbirds. **Animal Behaviour**, n. 104, p.123–129, 2015.

TOLEDO, Marcelo Arruda Fiuza de. **Aspectos temporais da organização coletiva do forrageamento em formigas saúvas (*Atta sexdens rubropilosa*)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Geral) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

WALL, K.; LEWIS, L. M.; DEIBEL, S. H.; HALLETT, D.; SKINNER, D. M.; THORPE, C. M. Consistent meal times improve performance on a daily time-place learning task. **Behavioural Processes**, v. 160, p. 26-32, 2019.

WEBER, A. The Fungus-Culturing Behavior of Ants. **American Zoologist**, v. 12, n. 3, p. 577–587, 1972.

WEHNER, R.; BLEULER, S.; NIEVERGELT, C.; SHAH, D. Bees Navigate by Using Vectors and Routes Rather than Maps. **Naturwissenschaften**, v. 77, p. 479- 482, 1990.

WETTERER, J. K. The ecology and evolution of worker size-distribution in leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 34, n.1, p. 119–144, 1999.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*) I. The Overall Pattern in *A. sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 7, n. 2, p. 143-156, 1980.

WILSON, E. O. **Sociobiology**: the new synthesis. Harvard University Press, 2000.

WILSON, E.O; HÖLLDOBLER, B. **The ants**. The Belknap Press of Harvard University Press Cambridge. Massachusetts. 1990.