UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS
DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

Variações ontogenéticas nos parâmetros do ritmo respiratório de operárias de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).

LAURA VARELLA TEIXEIRA

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área: Entomologia.

RIBEIRÃO PRETO/ SP
2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS
DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

Variações ontogenéticas nos parâmetros do ritmo respiratório de operárias de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).

Laura Varella Teixeira
Prof^a. Dr^a. Mirian David Marques (orientadora)

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área: Entomologia.

RIBEIRÃO PRETO/ SP
2006

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Mirian David Marques, pela orientação, por todo o incentivo, disposição e amizade.

Ao Prof. Ronaldo Zucchi e Dr. Sidnei Mateus, que sempre colaboraram muito, pelas dicas e discussões sobre abelhas sem ferrão.

Ao Prof. Carlos A. Navas, que gentilmente disponibilizou seu laboratório e o equipamento de respirometria. Aos alunos do Prof. Navas: Renata, Gustavo, Pedro, Isabel, José, Fernando e Lucas, que pacientemente ajudaram a utilizar o equipamento de respirometria.

Ap Prof. José Guilherme Chui-Berlinck e Prof. Jose Eduardo Bicudo, que forneceram bibliografia, ajudaram na formulação dos protocolos e resolveram todas as minhas dúvidas sobre respirometria.

Ao Leandro Lourenção (ICB/USP), que ajudou a fazer as análises estatísticas e a utilizar o programa El Temps.

Ao Prof. Jim Waterhouse, que discutiu a forma de análise dos dados e deu várias dicas importantes.

Aos amigos e colegas – do Laboratório de Entomologia na USP de Ribeirão: Selma, Eunice, Michi, Veronika, Dirk, Stefan, Ivelize, Fabio, Gustavo, Sérgio, Carol, Solange, Gesline, Rogério, Michelle e Fabrício; do Museu de Zoologia: Débora, Cíntia, Lara, Laura, Fábio e Paulo – pela companhia, trocas de idéia e boa convivência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia (FFCLRP/USP), por todo o apoio.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

ÍNDICE

SUMÁRIO	ii
SUMMARY	iii
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	12
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO	44
CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

SUMÁRIO

As abelhas eussociais apresentam uma estrutura organizacional que promove, ao longo da vida das operárias, uma série de transições comportamentais, regidas pela divisão etária de trabalho. Operárias inicialmente confinadas no interior do ninho, onde o ambiente é homogêneo e controlado, passam por uma série de mudanças, culminando na atividade de forrageamento, quando são expostas às variações do ambiente externo. A transição entre as diferentes atividades acompanha uma alteração no nível de contato e percepção das pistas ambientais, conforme as tarefas levam as operárias para as proximidades do tubo de saída e, finalmente, para o exterior. Os componentes temporais rítmicos, associados à complexa arquitetura espacial das colônias e características da divisão de trabalho são essenciais para a organização eussocial, mantendo a seqüência e coordenação das atividades exercidas por operárias e rainha. O objetivo deste trabalho foi medir o consumo de oxigênio de operárias de *Melipona quadrifasciata*, visando caracterizar aspectos cronobiológicos em diferentes etapas do desenvolvimento pós-embrionário. Três grupos de operárias foram estudados: recém-emergidas (24-48h de idade, grupo i), de idade média (10-15 dias, grupo ii) e forrageadoras (mais de 25 dias, grupo iii). As medidas de consumo de oxigênio foram feitas por respirometria intermitente, em condição de escuro constante, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, alimento e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados com operárias individualmente isoladas, o que garante um protocolo experimental no qual o ritmo endógeno seja caracterizado sem a interferência de fatores sociais e mantendo a variação interindividual. Cada série temporal foi estabelecida pelo agrupamento de séries, com 24h de duração cada uma, de diferentes indivíduos mantidos em condições experimentais idênticas. Os resultados obtidos comprovam que as operárias dos três grupos apresentam ritmicidade circadiana no consumo de oxigênio, mostrando que os ritmos circadianos estão presentes nas operárias desde a idade de 24-48h. Entre os parâmetros dos ritmos circadianos, o que apresentou maior variação foi a amplitude do consumo de oxigênio: o grupo i exibiu valores de amplitude aproximadamente dez vezes menores que os do grupo iii, sendo os valores do grupo ii intermediários. Freqüências ultradianas significativas foram observadas em todas as operárias estudadas, sendo que a potência espectral em relação à freqüência circadiana foi maior para a idade de 24-48h. Nestas operárias mais jovens, é provável que a ritmicidade ultradiana esteja relacionada à atividade de oviposição da rainha. Os dados obtidos na primavera mostram ciclos de consumo médio de oxigênio mais claros em relação aos dados de inverno. Na primavera a amplitude do consumo de oxigênio foi maior, exceto para as forrageadoras, o que pode ser um indício de estratégias sazonais ligadas à atividade reprodutiva (POP). Os componentes temporais rítmicos, associados aos componentes espaciais, são essenciais na manutenção e coordenação das atividades em uma colônia de abelhas eussociais. A execução de diferentes tarefas inter-relacionadas depende de uma coordenação precisa entre as operárias. Dessa forma, o estudo da organização rítmica, associada ao polietismo etário, traz informações importantes para a compreensão da biologia de uma colônia eussocial.

SUMMARY

The eusocial organization promotes a behavioural development of adult worker-bees, based on an age-related division of labour. Workers switch from tasks inside the hive to foraging and undergo a progressive transition from controlled environment of the hive to a diurnal exposure to the environment outside the hive. The coordination of queen and workers' activities depends on the association of spatial organization of the colony and rhythmicity of bees. This work aimed to detect possible changes in chronobiological parameters during the post-embryonic development of *Melipona quadrifasciata* workers. Three groups of workers were studied: age 24-48h (group i), 10-15 days old (group ii) and foragers (more than 25 days old, group iii). Oxygen consumption of individually isolated workers was determined by intermittent respirometry (experiment conditions were constant darkness, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, water and food *ad libitum*). For the establishment of a time series, a set of 24h measurements were made under the same conditions in different individuals of the same age. This protocol allowed the characterization of endogenous rhythms with no social influence. Chi-square periodogram analysis revealed that oxygen consumption of all workers studied was controlled by an endogenous circadian clock. *M. quadrifasciata* workers are therefore rhythmic since the age of 24-48h. Cosinor analysis revealed that amplitude of oxygen consumption changed according to age: group i showed low values, while group iii showed large values (about ten times larger than group i). Ultradian frequencies were detected for all worker groups. The ultradian strength was larger in group i, and might be related to the frequency of queen ovipositions. Data collected during spring showed clearer oxygen consumption cycles in comparison to data collected during winter. Amplitude values were larger in spring, except for group iii, suggesting that seasonal strategies may occur in reproductive activities (POP). The association of rhythmic and spatial properties is essential to the precise organization of an eusocial bee colony. Thus, the study of rhythmicity integrated to division of labour is important to elucidate many questions concerning eusocial bees biology.

INTRODUÇÃO

Cronobiologia

A cronobiologia refere-se ao estudo das características temporais da matéria viva, em todos os seus níveis de organização (Halberg, 1969). A organização temporal de um organismo vivo é expressa de duas formas: como resposta direta a estímulos ambientais e como ritmicidade (Menna-Barreto, 2003). Os ritmos biológicos, já detectados em quase todos os grupos eucariotos e em alguns procariotos, são componentes essenciais à adaptação dos seres vivos às condições cíclicas do planeta (Menna-Barreto, 1991).

Nos insetos, a ritmicidade biológica controla uma extensa variedade de comportamentos e o momento da ocorrência de processos fisiológicos, tanto em nível individual quanto populacional. Os ritmos mais bem estudados são aqueles de locomoção, alimentação, acasalamento, eclosão e ritmos de deposição de cutícula (Saunders, 2002).

Os mecanismos orgânicos responsáveis pela ritmicidade - relógios biológicos - são endógenos e autônomos (Bünning, 1967). A geração de oscilação pelos relógios biológicos independe das condições ambientais, mas ciclos ambientais influenciam as características da oscilação, como período e fase (Aschoff, 1960). Como qualquer fenômeno oscilatório, os parâmetros do ritmo biológico são descritos pelos componentes físicos básicos de uma oscilação. Eles estão representados na figura 1.

A comprovação da presença dos ritmos endógenos e o estudo de suas características são possíveis apenas por experimentos, nos quais os organismos são mantidos em condições ambientais constantes. Nessas condições os ritmos são ditos em *livre-curso*, e sua expressão corresponde às oscilações produzidas endogenamente pelos relógios biológicos (Pittendrigh, 1981). Em situação de livre-curso, um ritmo é caracterizado principalmente pelo seu período (τ), que é ligeiramente diferente do observado em condições naturais. O período em livre-curso originou o termo *circadiano*, de “circa” (“ao redor de”) e “diano” (“um dia”) (Halberg, 1959). O τ é espécie-específico, embora possa apresentar variações interindividuais (Pittendrigh e Daan, 1976) e variações de acordo com a condição ambiental adotada nos experimentos (Aschoff, 1960).

Os relógios biológicos são sensíveis a determinados ciclos ambientais, denominados *Zeitgebers* (do alemão “doador de tempo”, Aschoff, 1960). Os *Zeitgebers* promovem a vinculação dos ritmos gerados endogenamente com o meio ambiente, por meio de um processo particular de sincronização denominado arrastamento (Pittendrigh, 1960). O arrastamento ajusta os componentes do ritmo endógeno ao período e à fase dos ciclos ambientais, definindo o período do ritmo observado e promovendo o estabelecimento de uma relação precisa entre as fases do ritmo biológico e as fases

do ciclo ambiental. O arrastamento é indispensável à adaptação temporal, e define o nicho temporal de uma espécie, caracterizando-a como diurna, noturna ou crepuscular (Marques *et al.*, 2003).

Figura 1. Um ciclo consiste numa seqüência de eventos que se completa em um intervalo de tempo, o período (P), sendo que esta seqüência é repetida; ciclos de eventos que se repetem com igual período são chamados ritmos. Os estados de um processo biológico ou de um ciclo ambiental são denominados fases (F1, F2, F3). A amplitude (A) é o valor da diferença entre os valores máximo ou mínimo em relação ao valor médio ou mesor (M) da oscilação (Marques e Menna-Barreto, 2003).

O arrastamento por ciclos ambientais permite que eventos biológicos sejam ajustados no tempo, sendo uma vantagem seletiva a restrição desses eventos à fase do ciclo ambiental na qual as condições são mais favoráveis à sobrevivência da espécie. O caráter endógeno da ritmicidade confere, como principal significado adaptativo, a possibilidade de antecipação. Os organismos sofrem alterações morfológicas/fisiológicas antes das mudanças cíclicas do ambiente, o que garante que estejam preparados quando as novas condições ambientais se instalarem (Hastings *et al.*, 1991).

Diversos ciclos ambientais podem arrastar um único ritmo biológico, de acordo com uma hierarquia. Os *Zeitgebers* mais estudados são ciclos claro/escuro, ciclos diários de temperatura e umidade relativa, estações do ano, ciclos bióticos como disponibilidade de alimento, competição, predação e fatores sociais (Marques *et al.*, 2003).

Os “circa-ritmos” presentes nas mais diferentes espécies de plantas, procariotos e animais compartilham as mesmas propriedades que podem ser resumidas como: (1) a ritmicidade é gerada por osciladores, e persiste na ausência de pistas ambientais (os osciladores são endógenos); (2) o período (τ) do ritmo em livre-curso é parecido, mas nunca igual ao período do ciclo ambiental ao qual é vinculado; (3) homeostase do τ , que é pouco ou nada alterado quando exposto a variações ambientais físicas, químicas e biológicas, especialmente em relação à temperatura (compensação de τ

a variações de temperatura, sendo o valor de Q_{10} aproximadamente igual a 1); (4) arrastamento dos ritmos endógenos por ciclos ambientais, de forma que τ passa a ser equivalente ao período do ciclo ambiental (*Zeitgeber*), e é estabelecida uma relação de fase estável entre ritmo biológico e *Zeitgeber* (Saunders, 2002).

Um organismo cujos ritmos estão arrastados por um *Zeitgeber* pode ainda reagir diretamente a um estímulo ambiental, que modifica instantaneamente a expressão rítmica, sem apresentar efeitos nos dias subseqüentes. Esta ação direta de alguns fatores ambientais constitui-se em um processo conhecido como mascaramento (ou modulação). O mascaramento pode ser positivo, quando o agente mascarador promove um aumento da expressão rítmica, ou negativo, caso diminua ou suprima a expressão rítmica (Marques *et al.*, 2003).

O mascaramento difere do arrastamento porque: (1) o fator ambiental mascarador não precisa ser cíclico; (2) o mascaramento modifica o ritmo expresso pelo organismo, sem interferir na atividade oscilatória do relógio biológico e (3) o mascaramento tem duração igual a duração do fator ambiental mascarador (Aschoff, 1988).

Sendo independente da atividade dos osciladores do organismo, o mascaramento não produz o fenômeno da antecipação, como observado nos ritmos arrastados. A possibilidade de resposta direta e imediata a um estímulo ambiental, sem que esse estímulo seja necessariamente um ciclo, proporciona ao organismo uma flexibilidade em relação a ritmicidade gerada endogenamente. A reação ao estímulo mascarador também é específica da espécie e pode representar um importante mecanismo de sobrevivência ou de preservação da espécie. Um exemplo é a resposta de alerta, mesmo durante o repouso, apresentada pela fêmea do grilo *Teleogryllus commodus* quando em presença da estridulação emitida pelo macho (Loher, 1979). Exemplos como este permitem dizer que o mascaramento tem um papel importante na adaptação temporal, sendo responsável pela plasticidade do sistema circadiano (Page, 1989).

Ação de osciladores durante o desenvolvimento

Estudos fisiológicos e moleculares indicam que não há apenas um relógio biológico, mas um sistema de osciladores acoplados que coletivamente mantêm a organização temporal em um organismo. Os osciladores integrados encontram-se no protocérebro dorsal e no complexo *corpora cardiaca/allata* dos insetos, compondo um sistema temporal central. O termo relógio biológico refere-se, portanto, a uma rede de osciladores interconectados. O sistema temporal central regula eventos importantes no organismo, através de eferências neurais e hormonais que regulam a ritmicidade em tecidos-alvo. Osciladores periféricos já foram descritos, em insetos, em diversos tecidos epidérmicos, cerdas das antenas de *Drosophila* e sistema reprodutor masculino de mariposas (Steel & Vafopoulou, 2002).

Conjuntos de genes envolvidos no controle da geração de oscilação já foram descritos em cianobactérias, *Neurospora*, *Drosophila* e mamíferos. Estes sistemas têm em comum, um mecanismo molecular que envolve os processos de transcrição e tradução, modificação e degradação de proteínas, sendo o mecanismo molecular regulado por retroalimentação negativa entre os processos (Dunlap, 2004).

Embora os ritmos circadianos já tenham sido estudados sob diversas perspectivas, pouco se sabe sobre o momento de diferenciação dos osciladores durante o desenvolvimento embrionário, e quais os efeitos do meio ambiente na ontogênese da organização circadiana. Em insetos holometábolos, há evidências de que a diferenciação dos osciladores circadianos ocorre em fases precoces do desenvolvimento (Page, 1985).

Em alguns estudos embrionários, apesar da presença de oscilações rítmicas produzidas pelos relógios, não se observa a expressão dos ritmos, provavelmente devido à imaturidade dos sistemas efetores envolvidos. Também é possível observar ritmicidade sem vinculação com ciclos ambientais (com as características de um ritmo em livre-curso), devido à imaturidade dos sistemas aferentes, que levam aos osciladores informações sobre o estado dos *Zeitgebers* (Andrade *et al.*, 2003).

Em embriões de *Drosophila*, foi detectada a expressão de genes ligados ao relógio, em uma fase anterior a detecção da atividade rítmica em estudos de comportamento (Sehgal *et al.*, 1992). Minis e Pittendrigh (1968) mostraram que lotes de ovos de mariposas têm seus ritmos de eclosão ajustados ao *Zeitgeber* a partir do sexto dia da embriogênese.

A ontogênese do sistema rítmico pode englobar não apenas as etapas iniciais de vida, mas também o desenvolvimento pós-embrionário e a senescência. O processo de ontogênese da ritmicidade circadiana envolve modificações em um ou mais parâmetros dos ritmos, como mudanças de τ , da amplitude, da composição de frequências, ou das relações de fase que os ritmos estabelecem com eventos ambientais e orgânicos (Andrade *et al.*, 2003). Em baratas, o τ do ritmo de atividade locomotora das ninfas aumenta significativamente de duas a três semanas após a eclosão (Page e Block, 1980).

Ritmos de diferentes frequências

Além dos ritmos circadianos, existem ritmos arrastados por ciclos ambientais de período diferente de 24h. Os ultradianos apresentam período menor que 24h, como ritmos ligados às marés; os infradianos, por outro lado, têm período maior que 24h, como os lunares e sazonais (DeCoursey, 2004). Ritmos de diferentes frequências ocorrem também nos insetos, que apresentam, por exemplo, diversas estratégias adaptativas às variações ambientais sazonais de temperatura, disponibilidade de alimento e umidade relativa, entre outras (Underwood *et al.*, 1997).

As estratégias adaptativas sazonais são mediadas pela ação dos relógios biológicos, que desencadeiam modificações neuro-endócrinas. Essas estratégias harmonizam as fases do ciclo de vida dos insetos às fases do ciclo sazonal do ambiente, através de mudanças fisiológicas e comportamentais relacionadas à possível ocorrência de diapausa, migração e polifenismo (Tauber *et al.*, 1986). A indução da diapausa é resultado, em geral, da interrupção da síntese dos hormônios protoracicotrópico, juvenil ou ecdisona (Saunders, 2002).

As respostas rítmicas, como adaptação a flutuações ambientais sazonais, permitem aos insetos antecipar-se à fase do ano desfavorável para a espécie, adotando estratégias comportamentais, morfológicas e fisiológicas antes que as condições ambientais mais drásticas se instalem. A antecipação observada nas respostas sazonais rítmicas é proporcionada por um mecanismo de medição do tempo, por meio de pistas ambientais. Essas pistas ambientais não são, em si, desfavoráveis aos insetos, mas determinam a tomada de uma via metabólica específica, a qual desencadeia as alterações necessárias para a sobrevivência durante a época desfavorável do ano (Page, 1985; Saunders, 2002). A pista ambiental mais confiável (com menor variação ano a ano) é o fotoperíodo, marcado pela variação ao longo do ano dos horários do crepúsculo matutino e vespertino. O fotoperíodo é responsável pela sinalização a longo prazo, determinando as grandes modificações dos padrões neuro-endócrinos que preparam os insetos para a estação desfavorável. Outras pistas ambientais, como a variação da temperatura e de fatores bióticos, têm papel importante na consolidação da estratégia adotada, mudança de forma, entrada em diapausa, migração, etc, assim que a estação se instala (Denlinger, 1986).

Diapausa, migração, mudanças de forma são estratégias controladas por osciladores endógenos. Todas elas acontecem em fases específicas da vida do inseto, geneticamente determinadas e sincronizadas pelo fotoperíodo. No entanto, além da ritmicidade endógena, a organização temporal de um organismo envolve algumas respostas diretas ao meio ambiente. Um exemplo de estratégia sazonal independente de qualquer medição de tempo é a quiescência. Consiste em mecanismos fisiológicos que permitem a sobrevivência dos insetos sob condições adversas, e é diretamente imposta pelas condições ambientais. O término da quiescência ocorre tão logo as condições ambientais voltem a ser favoráveis (Tauber *et al.*, 1986). De uma forma geral, pode-se considerar o fenômeno da quiescência como um mascaramento de um ritmo infradianol.

Abelhas eussociais

A família Apidae é a mais diversa entre as famílias de abelhas, compreendendo grupos de comportamento que variam do solitário ao eussocial. Apenas dois grupos de abelhas apresentam comportamento eussocial: as tribos Apini (abelhas melíferas – gênero *Apis*) e Meliponini (abelhas sem ferrão). Ambas as tribos pertencem à subfamília Apinae, que engloba abelhas corbiculadas. Os Meliponini são pantrópicos, amplamente distribuídos nas regiões tropicais, enquanto os Apini são paleotrópicos (Michener, 2000).

As abelhas eussociais apresentam sobreposição de gerações, diferenciação de castas, inabilidade da rainha de formar novos ninhos solitariamente, rainhas sem estruturas morfológicas relacionadas à coleta e manipulação de alimento, sistema de comunicação e capacidade de termorregulação, além de formarem colônias perenes de arquitetura elaborada, com armazenamento de alimento (Michener, 1974; Sakagami, 1982).

A arquitetura elaborada das colônias de abelhas sem ferrão inclui elementos estruturais diferenciados, como o tubo de entrada, os potes de alimento, as células de cria e os pilares que conectam as estruturas. O principal material que compõe as estruturas do ninho é o cerume, uma mistura de cera produzida na região do tergo metassomal das abelhas, com resinas e gomas coletadas. Além do cerume, outros materiais podem ser utilizados, como barro, fezes de animais e fibras de plantas. Frequentemente placas de batume constituem um invólucro que veda a cavidade do ninho; o batume é formado por cerume, resina, e por vezes material vegetal e barro (Michener, 2000; Nogueira-Neto, 1997).

A região da cria, em muitas espécies, é envolta por um invólucro, composto por uma ou mais camadas de cerume, que separa a região da cria das demais regiões do ninho. Existem diferentes formas de organização das células de cria. A mais frequente corresponde a células alongadas e fundidas paralelamente, com a abertura voltada para cima, formando um ou mais favos horizontais, que conectados resultam em um arranjo em espiral. As células podem também ser construídas separadas umas das outras, conectadas apenas por pilares de sustentação, formando um arranjo em cacho. As células organizadas em cacho têm forma alongada ou esférica, e são construídas com a abertura voltada para cima ou para diferentes direções. Regiões de cria do tipo cacho não são delimitadas por invólucro (Wille, 1983).

A construção de novas células de cria, seguida pelo provisionamento com alimento, a oviposição pela rainha e por fim a operculação das células compõem uma cadeia de eventos ordenados e integrados, denominada POP. Essa sequência de eventos é uma autapomorfia dos Meliponini e é caracterizada pela utilização das células uma única vez (após a emergência, as células são destruídas), pelo provisionamento em massa (todo o alimento para o desenvolvimento é fornecido antes da oviposição, não havendo contato entre adultos e imaturos após a operculação), e por complexas interações entre rainha e operárias. A comunicação entre rainha e operárias pode ser explícita (através de sinais ritualizados) ou implícita (por meio de feromônios). Nas espécies em que as operárias apresentam ovários desenvolvidos pode ocorrer a oviposição por operárias, sendo o ovo em geral ingerido pela rainha. Existe uma grande diversidade comportamental no POP, com particularidades entre as diferentes espécies. Variações no POP são também observadas em colônias órfãs, com desequilíbrio populacional, ou com uma rainha muito jovem ou velha (Zucchi *et al.*, 1999).

Nos Apini, a arquitetura dos ninhos, a construção e utilização das células de cria apresentam diferenças em relação aos Meliponini. As abelhas melíferas constroem células hexagonais tanto para a cria quanto para o armazenamento de alimento, sendo que as células são dispostas em

favos verticais. A construção das células é sincrônica, e as oviposições ocorrem em células vazias. As larvas são alimentadas progressivamente por operárias adultas, e as células são fechadas após o final do estágio larval. Cada célula é reutilizada diversas vezes (Sakagami, 1982).

Em uma colônia de abelhas eussociais há uma divisão de trabalho entre as operárias, sendo que tarefas distintas são exercidas simultaneamente por grupos de indivíduos especializados. Essa divisão de trabalho configura um polietismo etário, no qual cada operária passa por diferentes fases comportamentais, exercendo diferentes tarefas de acordo com sua idade (Robinson, 1992 e referências).

A seqüência e a duração das atividades exercidas pelas operárias apresentam particularidades de acordo com a espécie e com a condição de cada colônia (Simões e Bego, 1991; Gordon, 1996; Grosso e Bego, 2002; Elekonich e Roberts, 2005). As atividades podem ser, entretanto, generalizadas em alguns estágios, na seguinte ordem temporal: limpeza (*grooming*); reparos nas células de cria; construção e aprovisionamento de células, limpeza do ninho e alimentação de jovens adultos e da rainha; limpeza do ninho, reconstrução do invólucro, recepção de néctar e atividade de guarda na entrada do ninho; e por último forrageamento (Wille, 1983).

A divisão de trabalho, quando relacionada à arquitetura das colônias, pode ser considerada centrífuga (Bourke e Franks, 1995). As operárias mais jovens permanecem na região mais interna do ninho (área da cria), e conforme envelhecem passam a exercer tarefas progressivamente mais próximas à periferia e saída da colônia. Quando atingem a fase mais madura, passam a sair da colônia em vôos de forrageamento. Assim, as operárias passam por uma transição do microclima homogêneo e controlado presente na região da cria (escuro constante, temperatura controlada), para o ambiente heterogêneo externo.

O polietismo etário apresenta plasticidade, permitindo uma distribuição dinâmica de tarefas específicas para um número determinado de operárias, de acordo com a situação ecológica (Gordon, 1996). A plasticidade na divisão de trabalho é influenciada por fatores internos, como genótipo das operárias, e por fatores ambientais, que determinam a condição interna das colônias (por exemplo a quantidade de alimento armazenado), e a taxa de nascimento e morte de operárias (variável nas diferentes fases do ano) (Fukuda, 1983; Giray e Robinson, 1994).

Cronobiologia das abelhas eussociais

Apini

Os Apini são um dos grupos mais estudados na área da cronobiologia de insetos. A habilidade das abelhas melíferas de retornar a uma fonte de alimento todos os dias no mesmo horário é conhecida desde o início do último século, com os trabalhos de von Buttel-Reepen (1900) e Forel (1910) (citados em Saunders, 2002).

Beling (1929 *apud* Saunders, 2002) treinou abelhas melíferas, oferecendo uma fonte artificial de alimento sempre no mesmo horário. Após alguns dias, observou que as abelhas retornavam a fonte artificial no horário do treinamento, mesmo sem a oferta de alimento na fonte. Seus experimentos mostraram que as abelhas podem ser treinadas para comparecer a uma fonte de alimento a qualquer hora do dia, inclusive em vários horários diferentes, desde que o intervalo entre os horários de oferta de alimento difiram em no mínimo duas horas.

Essa memória temporal das abelhas (*Zeitsinn* ou *Zeitgedächtnis*) foi considerada de caráter endógeno, embora alguns autores discordassem. A fim de comprovar a endogeneidade da memória temporal, Renner (1955, 1957 *apud* Saunders, 2002) treinou abelhas a uma fonte artificial de alimento, em uma sala de vôo mantida em claro constante e temperatura constante, em Paris (2°L), entre 8:15 e 10:15h (horário local). A colônia foi então transportada, durante a noite, para Nova York (74°O, a diferença de fuso-horário em relação a Paris é de cinco horas). No dia seguinte, submetidas às mesmas condições de laboratório, as abelhas foram testadas: compareceram na fonte de alimento 24h após o último horário de treinamento feito em Paris (às 15:00 no horário de Nova York). O transporte da colônia treinada de Nova York para Paris teve resultados semelhantes. Esses experimentos foram repetidos em uma colônia mantida no campo, transportada de Nova York para a Califórnia, comprovando mais uma vez o caráter endógeno da memória temporal (Renner, 1959 *apud* Saunders, 2002).

Moore *et. al.* (1989) mostraram que a precisão da memória temporal varia ao longo do dia, sendo maior na fase da manhã. Essa variação diária da acurácia foi considerada um padrão comportamental circadiano e, portanto, endógeno. Foi sugerido, então, que a memória temporal compreende dois processos distintos: o primeiro varia ao longo do dia e determina o nível de antecipação observado no forrageamento; o segundo consiste na medição constante de tempo, que não apresenta variação diária, e permite que as abelhas sejam treinadas em qualquer horário(s) do dia. Pittendrigh (1958), reconhecendo a particularidade da ritmicidade de forrageamento, designou o segundo processo como relógio biológico “continuamente consultado”.

A comprovação da memória temporal (ou ritmo circadiano de forrageamento) forneceu os primeiros indícios de que a organização circadiana, permitindo uma medição de tempo pelos organismos, apresenta significado adaptativo (Moore-Ede *et al.*, 1982). O sistema circadiano permite que as abelhas sincronizem a atividade de forrageamento com o ritmo diário de floração, restringindo sua atividade às fases em que a disponibilidade de néctar e pólen é adequada, economizando energia que, de outra forma, seria perdida em vôos improdutivos.

Uma segunda linha de pesquisa relacionada à atividade de forrageamento das abelhas surgiu nas décadas de 50 e 60. Von Frisch (1950 *apud* Saunders, 2002), von Frisch e Lindauer (1954 *apud* Saunders, 2002) e Lindauer (1960 *apud* Saunders, 2002) realizaram experimentos sobre a orientação das abelhas no campo. Treinaram as abelhas para forragear em uma fonte artificial de alimento, posicionada em direção a um dos pontos cardeais em relação à colônia. Após mudar a

colônia de lugar durante a noite, as abelhas continuaram voando em direção ao mesmo ponto cardeal da fase de treinamento. Isso mostra que as abelhas orientam-se a partir da posição do sol, identificando qualquer direção. Considerando que a posição e ângulo do sol mudam conforme o horário do dia, o mecanismo de medição de tempo “continuamente consultado” é essencial para a orientação correta (Saunders, 2002).

Após a década de 60, quando surgiu a cronobiologia, diversos trabalhos caracterizaram o ritmo circadiano das forrageadoras. Spangler (1972) e Moore e Rankin (1985) realizaram experimentos com forrageadoras isoladas, registrando a atividade locomotora em condição de livre-curso. Mostraram que o ritmo circadiano apresenta τ menor que 24h em escuro constante, τ maior que 24h em claro constante.

Em relação ao arrastamento do ritmo circadiano, Moore e Rankin (1993) comprovaram que ciclos claro/escuro e ciclos de temperatura (com variação de amplitude de no mínimo 10°C) arrastam o ritmo de atividade locomotora de forrageadoras isoladas. Frisch e Aschoff (1987), mantendo colônias em salas de vôo, observaram que em condições constantes de luz, temperatura e alimento as forrageadoras apresentaram um ritmo circadiano em livre-curso. Quando expostas a condições constantes de luz e temperatura, mas com disponibilidade de alimento por apenas duas horas por dia, o ritmo das forrageadoras é arrastado, estabelecendo um ângulo de fase estável entre o início da fase de atividade e o início da fase de disponibilidade de alimento (ou seja, ciclo de disponibilidade de alimento também é *Zeitgeber* do ritmo).

Southwick e Moritz (1987) e Moritz e Kryger (1994) mostraram que grupos de forrageadoras, isoladas da colônia, sincronizam seus ritmos circadianos de consumo de oxigênio, passando a exibir uma oscilação circadiana de período e fase comuns. Foi sugerido que esse *Zeitgeber* social possa ser desencadeado por interações físicas entre as operárias e/ou por feromônios.

Frisch e Koeniger (1994) também comprovaram a existência de um *Zeitgeber* social. Estudaram o ritmo locomotor de colônias (ritmo de saídas e entradas das forrageadoras) e de forrageadoras isoladas das colônias. Mostraram que, após cerca de 14 dias, a coincidência de fases entre os ritmos da colônia e das forrageadoras isoladas é totalmente perdida. Além do arrastamento social entre operárias, há também um arrastamento social promovido pela rainha (Moritz e Sakofski, 1991). A introdução de uma rainha em um grupo de operárias isoladas da colônia promove um deslocamento da fase do ritmo metabólico das operárias, o que resulta na sincronização de todo o grupo.

Além dos estudos de ritmos de forrageadoras, diversos autores estudam a ritmicidade das operárias em relação à divisão de trabalho. Observações do comportamento das operárias na colônia indicam uma ontogênese da ritmicidade circadiana (Free *et al.*, 1992; Crailsheim *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 1998). Operárias individualmente isoladas também mostram uma ontogênese da ritmicidade

circadiana na atividade locomotora, passando de uma condição arritmica quando jovens para rítmica quando forrageadoras (Moore *et al.*, 1996; Toma *et al.*, 2000).

Uma hipótese levantada foi a de que altos níveis de hormônio juvenil (HJ) desencadeariam a atividade de forrageamento e, portanto, a consolidação de um ritmo circadiano de atividade. Essa hipótese surgiu a partir de trabalhos que mostraram níveis de HJ muito altos nas forrageadoras em comparação com operárias jovens (Bloch *et al.*, 2002). No entanto, operárias que sofrem alatectomia também se tornam forrageadoras, apenas com atraso em relação às operárias controle (Sullivan *et al.*, 2000). Assim, o HJ acerta a fase da vida em que uma operária torna-se forrageadora, mas não é o fator que desencadeia o forrageamento e, por conseguinte, a atividade rítmica.

Utilizando métodos imunocitoquímicos, Bloch *et al.* (1999) marcaram os neurônios que reagem a uma proteína do relógio biológico (PER) no cérebro de operárias. A quantidade de células marcadas aumenta com o aumento da idade das operárias. Porém, Toma *et al.* (2000) mostraram que os níveis de mRNA da mesma proteína são semelhantes em forrageadoras precoces e não precoces, indicando que a expressão do gene em questão é influenciada pela organização social da colônia.

Com a criação de colônias e o valor comercial da produção de mel, diversos criadores observaram que a produtividade e o comportamento das abelhas varia nas diferentes épocas do ano. Vários autores passaram a estudar, então, a sazonalidade das colônias, observando que as abelhas apresentam estratégias adaptativas para sobreviver ao frio do inverno nas regiões temperadas (Michener, 1974).

As operárias que emergem no outono encontram uma colônia com poucas células de cria a serem alimentadas e alimento armazenado. Essas operárias apresentam corpo gorduroso volumoso com glóbulos de proteína, glândulas hipofaríngeas hipertrofiadas, e longevidade prolongada. As operárias têm seu metabolismo reduzido e aglomeram-se em *clusters*, onde ocorre termorregulação ativa (Maurizio, 1959 *apud* Michener, 1974; Heinrich, 1974).

Ao final do inverno e início da primavera, a quantidade de favos de cria, diminuída, volta a aumentar. Quando a disponibilidade de alimento volta a ser abundante, a colônia volta a crescer em população e quantidade de alimento armazenado (Michener, 1974).

Meliponini

A cronobiologia dos Meliponini é ainda pouco estudada. Os estudos feitos indicam semelhanças em relação aos Apini, em especial quanto aos ritmos circadianos bastante pronunciados nas forrageadoras. Há evidências de diferenças entre Apini e Meliponini em aspectos temporais das atividades relacionadas a oviposição e cuidados com a cria.

Os trabalhos realizados com sensores de movimento mostraram a presença de ritmicidade circadiana na atividade de forrageamento de *Scaptotrigona aff. depilis* (Bellusci e Marques, 2001) e na atividade no interior do tubo de saída de colônias de *Frieseomelitta varia* (Almeida, 2004).

Observações do POP de *Frieseomelitta varia* indicaram que, embora a atividade ocorra ao longo das 24h, há uma variação diária no número de células em estágio de construção (Teixeira, 2003). Colônias de *F. varia* e *F. doederleini* conectadas a um ambiente externo constante apresentam um ritmo circadiano de oviposições pela rainha. Em *F. varia*, as oviposições ocorrem ao longo do dia com variação circadiana de amplitude, enquanto em *F. doederleini* as oviposições são agrupadas, ocorrendo em uma fase específica (Bellusci, 2003).

O consumo de oxigênio de operárias de *Scaptotrigona aff. depilis* isoladas também foi estudado (Giannini, 1998). Além das forrageadoras, foram testadas operárias mais jovens, alocadas em tarefas na região da cria, e os resultados indicaram ritmos circadianos para ambos os grupos. A idade das operárias utilizadas no trabalho, no entanto, é desconhecida. O consumo de oxigênio das forrageadoras de *Tetragonisca angustula fiebrigi*, *T. a. angustula* e *Trigona spinipes* foi também estudado por Proni e Macieira (2004), que mostraram um ritmo diário na taxa respiratória destas abelhas.

O acompanhamento de colônias de *F. varia* por dois anos mostrou que as colônias permanecem ativas por todo o ano, mas a amplitude das atividades varia conforme o mês. O processo de construção de células de cria apresenta um padrão sazonal, que se repetiu nos dois anos, indicando a existência de um ritmo sazonal endógeno. A atividade de vôo variou de acordo com o mês, mas houve um padrão sazonal distinto para cada ano, possivelmente ditado por fatores ecológicos. Resta esclarecer qual seria o mecanismo de medição de tempo do ritmo sazonal, já que a região da cria apresenta condições climáticas homogêneas e a atividade de vôo é alterada de um ano para outro, não fornecendo uma pista ambiental confiável (Teixeira, 2003).

As abelhas eussociais apresentam uma estrutura organizacional que promove, ao longo da vida das operárias, uma série de transições comportamentais. Operárias inicialmente confinadas no interior do ninho, onde o ambiente é homogêneo e controlado, passam por uma série de mudanças, culminando na atividade de forrageamento, quando são expostas às variações do ambiente externo. A transição entre as diferentes atividades acompanha uma alteração no nível de contato e percepção das pistas ambientais, conforme as tarefas levam as operárias para as proximidades do tubo de saída e, finalmente, para o exterior. Além disso, a execução de tarefas tão distintas implica em transformações fisiológicas e genéticas relacionadas às mudanças de padrões comportamentais.

Todas essas características tornam as abelhas eussociais um excelente modelo de estudo para áreas como aprendizagem, memória, percepção e processamento sensorial, e ritmicidade. Os

componentes temporais rítmicos, associados à complexa arquitetura espacial das colônias e características da divisão etária de trabalho são essenciais para a organização eussocial, mantendo a seqüência e coordenação das atividades exercidas por operárias e rainha.

Considerando a respirometria como método de medida indireta da atividade metabólica, o objetivo deste trabalho foi medir o consumo de oxigênio de operárias de *Melipona quadrifasciata*, visando caracterizar aspectos cronobiológicos em diferentes etapas do desenvolvimento pós-embrionário. Os aspectos cronobiológicos considerados foram: (i) ritmicidade ultradiana/circadiana do consumo de oxigênio em condição de livre-curso e (ii) comparação da ritmicidade do consumo de oxigênio observada em duas fases do ano, inverno e primavera.

O estudo destes aspectos cronobiológicos constitui a primeira etapa para a compreensão da ontogênese do sistema temporal nas operárias de uma colônia de abelhas sem ferrão.

MATERIAL E MÉTODOS

Sistema biológico e local de estudo

O gênero *Melipona* pertence à tribo Meliponini, subfamília Apinae, família Apidae. Compreende meliponíneos robustos - 8 a 15mm de comprimento - encontrados desde Silanoa e Tamaulipas, no México, até Tucumán e Misiones, Argentina. Os ninhos são formados tipicamente em cavidades de árvores, embora algumas espécies formem ninhos no solo (Michener, 2000).

O sistema biológico escolhido para o estudo foi *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (figura 2). A espécie é largamente distribuída nos estados costeiros do Brasil, desde Pernambuco até o Rio Grande do Sul (Kerr, 1951).

O projeto foi realizado em parceria com o Laboratório de Cronobiologia do Museu de Zoologia da USP - onde as colônias foram instaladas - e com o Laboratório de Ecofisiologia do Instituto de Biociências da USP, local de realização dos experimentos de respirometria, sob orientação do Prof. Dr. Carlos A. Navas. Ambos os laboratórios estão localizados em São Paulo/SP.

Um total de seis colônias de *M. quadrifasciata*, todas provenientes da região de Ribeirão Preto/SP, foram transportadas em novembro de 2004, janeiro e abril de 2005 para o Laboratório de Cronobiologia do Museu de Zoologia, onde foram mantidas em caixas-ninho de observação. As tampas de vidro das caixas-ninho eram cobertas por filtros vermelhos (Letravisión LV207 PAF-7, da Esselte), os quais garantiam que a iluminação incidente no interior das colônias fosse de comprimento 680nm, fora do espectro visível das abelhas. As caixas-ninho eram conectadas ao ambiente externo por mangueiras plásticas que atravessavam uma janela do laboratório. Eventualmente as colônias receberam solução aquosa de açúcar (aproximadamente 50%) e pólen misturado à solução de açúcar.

Respirometria como método de medição de ritmos biológicos

A maioria dos estudos de ciclo vigília/sono de insetos é feita por registro de atividade locomotora, utilizando equipamentos como rodas de atividade, actógrafos e sensores infra-vermelhos. Nesses estudos, considera-se sono como a ausência do tipo de atividade locomotora detectada pelo aparato experimental (Saunders, 2002).

O sono das forrageadoras já foi caracterizado nos Apini (Kaiser, 1988; Sauer *et al.*, 2003), e sabe-se que repouso nem sempre corresponde ao sono, sendo preciso associar outras metodologias, como medição da temperatura torácica, para tornar os resultados confiáveis (Rothe e Nachtigal, 1989). A respirometria foi escolhida, nesse projeto, como método indireto de medição do ritmo metabólico dos meliponíneos, devido às complicações metodológicas do estudo de seus ritmos através da atividade locomotora.

As medidas de consumo de oxigênio foram feitas pelo método da respirometria intermitente. Este tipo de respirometria combina características da respirometria aberta (na qual um fluxo de ar é mantido nas câmaras metabólicas) com características da respirometria fechada (sem fluxo de ar).

Na técnica intermitente, um fluxo de gás padrão de composição conhecida (ar do ambiente externo ao laboratório) é bombeado para o sensor de oxigênio, determinando a condição inicial - linha de base - para o sensor. Em seguida, um alto fluxo de gás padrão é bombeado para as câmaras metabólicas (onde são mantidas as abelhas), de forma a lavar o ambiente interno das câmaras. Após a lavagem, os gases presentes nas câmaras passam a apresentar as mesmas características conhecidas que definiram a linha de base no sensor de oxigênio (J.G. Chaui-Berlinck, informação pessoal).

Cumprida a etapa de lavagem das câmaras metabólicas, estas permanecem fechadas (sem fluxo de ar) por um intervalo de tempo pré-estabelecido. Durante o fechamento, as abelhas

consomem oxigênio e produzem gás carbônico, alterando a concentração fracionária destes gases no interior das câmaras.

Figura 2. Colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. **A.** Vista geral do ninho, com a região de cria no centro (c), envolta por invólucro (i), e potes de armazenamento de mel e pólen na periferia (p). **B.** Favo com células de cria operculadas e em processo de construção. **C.** Rainha junto à operárias durante o POP. (Foto A de *Proceedings of the 8th International Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas*, B e C de www.webbee.org.br)

Ao término da fase fechada, o fluxo de ar é restabelecido e bombeado novamente às câmaras. O sensor de oxigênio faz a leitura da quantidade de oxigênio presente no fluxo de ar,

fornecendo um sinal que indica a fração de oxigênio consumida nas câmaras durante a fase fechada, em comparação com a situação inicial (figura 3).

Figura 3. Respirometria: representação de um sinal obtido em relação à linha de base. A linha de base representa a fração de oxigênio no gás padrão. A integral do sinal indica quanto de oxigênio ficou ausente no fluxo de ar bombeado para o sensor após passagem pelas câmaras metabólicas.

O fluxo de ar enviado ao sensor de oxigênio passa sempre por substâncias que absorvem a água e o gás carbônico presentes no ar (sílica e ascarite, respectivamente). Um esquema de um sistema de respirometria intermitente é mostrado na figura 4 (J.G. Chaui-Berlinck, informação pessoal; Gomes *et al.*, 2004).

O volume de oxigênio consumido pelas abelhas foi calculado pela equação:

$$VO_2 = I \cdot F \cdot M^{-1} \cdot T^{-1}$$

Sendo: VO_2 o volume de oxigênio consumido ($\text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

I a integral do sinal obtido em relação à linha de base (%)

F a intensidade do fluxo de ar utilizado ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)

M a massa fresca das abelhas (g)

T o intervalo de tempo em que as câmaras permanecem fechadas (min)

Figura 4. Esquema do equipamento de respirometria utilizado. O estabelecimento da linha de base depende de um fluxo de gás padrão bombeado para o sensor de O_2 (a). A obtenção do sinal para cálculo de consumo de O_2 depende do fluxo bombeado através das câmaras metabólicas para o sensor (b). Os fluxos de ar de intensidade conhecida (132,44 mL/min) são produzidos por uma bomba de ar (*Dual Pump System V 1.0, Sable Systems*) associada a um fluxímetro (*Matheson*). Os fluxos de ar sempre passam por absorventes de água e CO_2 (sílica e ascarite) antes de alcançarem o sensor de O_2 (*PA-1 O_2 Analyzer, Sable Systems*). O sinal é enviado para um computador, que registra o sinal (*Data Acquisition e Analysis Program, DAS release 2.0, Sable Systems, 1995*).

Protocolo experimental

Visando caracterizar os parâmetros temporais do processo respiratório de operárias em diferentes fases do desenvolvimento pós-embriônico, foram estabelecidos três grupos de operárias de *M. quadrifasciata*: (i) recém-emergidas, (ii) de idade média e (iii) forrageadoras.

O grupo i compreendeu operárias emergidas em favos isolados da colônia. Esses favos foram transferidos para uma placa de Petri, junto com aproximadamente 5 operárias adultas e xarope

de açúcar 50%. A placa de Petri com os favos foi mantida em estufa, a $33 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, em escuro, até a emergência de novas operárias. No dia em que emergiram, estas operárias foram marcadas com placas numeradas (*Opalithplättchen*). Em seguida à marcação, 50% das operárias foram inseridas em uma colônia, enquanto as demais foram transferidas para câmaras metabólicas ($25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, escuro), por um intervalo de tempo de 24h. As operárias do grupo i foram coletadas e transportadas para experimento, portanto, com idade entre 24-48h.

O grupo ii foi formado por operárias emergidas também em favos mantidos em estufa. No dia de emergência, as operárias foram marcadas e devolvidas à colônia, onde permaneceram por 10 a 15 dias. Após essa etapa, as operárias marcadas foram coletadas para experimento.

Já o grupo iii compreendeu forrageadoras, coletadas na entrada da colônia quando retornavam de vôos de forrageamento.

As coletas de dados consistiram em reunir 10 operárias de cada um dos grupos definidos acima, acondicioná-las em câmaras metabólicas (um indivíduo por câmara), transportar as câmaras para o Laboratório de Ecofisiologia do Instituto de Biociências da USP e instalar as câmaras metabólicas em uma câmara climática (Câmara Climática 102 FC, Eletrolab). As condições na câmara climática foram escuro constante (EE), temperatura $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, água e alimento *ad libitum* (algodão embebido em aproximadamente 1,5ml de água e algodão com mesmo volume de xarope 50% em cada câmara metabólica).

As operárias foram mantidas em condições ambientais constantes durante 24h, antes do início das medidas respirométricas. Cada experimento consistiu em uma leitura a cada duas horas, por 24h. Uma leitura equivale a 6 minutos de fluxo em uma câmara metabólica, com a formação de um sinal para cálculo do consumo de oxigênio da operária. Para cada operária houve, portanto, uma medida de consumo de oxigênio individual, sendo a leitura das câmaras efetuada em seqüência.

As câmaras metabólicas utilizadas eram cilíndricas, de vidro, e apresentavam volume de aproximadamente 65ml (volume livre, descontados os volumes dos tubos, abelha e objetos). Como foi fornecido alimento, em todos os experimentos mediu-se o consumo de oxigênio em uma câmara controle, apenas com a água e o alimento. Nos cálculos do VO_2 , o valor da integral da câmara controle foi descontado dos valores de integral das demais câmaras.

A fim de definir o período de tempo (T) em que as câmaras deveriam ficar fechadas antes de cada leitura, foram realizados experimentos-piloto. Nestes experimentos foram testadas diferentes durações de T, de forma que o consumo de oxigênio fosse suficiente para a formação de um sinal para os cálculos, mas cuidando para que o fluxo de ar não secasse a água e o alimento, e para que o volume de oxigênio no interior das câmaras não caísse para menos de 19,5%. O valor 19,5% de volume de oxigênio foi estabelecido a partir do trabalho de Van Nerum e Buelens (1997). Esses autores mostraram que, em *Apis mellifera*, a taxa metabólica é mantida inalterada quando o volume de O_2 encontra-se entre 21 e 19,5%, mesmo em níveis altos de CO_2 (até 6%).

No caso do grupo iii (forrageadoras), foram utilizadas câmaras com aproximadamente 12ml de gesso, para manter a umidade e evitar a desidratação das operárias devido ao fluxo freqüente de ar. Os valores T utilizados estão representados na tabela 1.

Os experimentos de inverno ocorreram entre 08 de julho e 27 de agosto de 2005; os de primavera entre 04 de outubro e 10 de dezembro de 2005.

Tabela 1. Intervalo de tempo (T) em que as câmaras metabólicas permaneceram fechadas antes de cada medida respirométrica, de acordo com o grupo de operárias.

Grupo	T (minutos)
i	114
ii	84
iii	18 (8:30 às 18:30h)
	24 (20:30 às 6:30h)

Exigências do protocolo experimental cronobiológico

A organização eussocial das colônias de meliponíneos exige condições experimentais particulares. Sabe-se que há um forte arrastamento social entre as operárias de uma colônia (Southwick e Moritz, 1987), e entre operárias e rainha (Moritz e Sakofski, 1991). Em Meliponini existem evidências de que o ciclo de oviposições da rainha modula o padrão temporal das operárias jovens alocadas em tarefas na região da cria (Bellusci, 2003). Dessa forma, para pesquisar a ritmicidade endógena, faz-se necessária a realização de experimentos com operárias isoladas. Embora seja uma condição artificial para meliponíneos, o isolamento de operárias garante um protocolo experimental no qual o ritmo endógeno seja caracterizado sem a interferência de fatores sociais (arrastamento social ou modulação pela atividade da rainha), e mantendo a variação interindividual.

Considerando a curta sobrevida de uma operária isolada, foi preciso adaptar os protocolos. Em geral, os experimentos cronobiológicos envolvem a aquisição de uma série temporal de dados de vários ciclos de 24h para cada indivíduo. No caso deste trabalho, cada série temporal foi estabelecida pelo agrupamento de séries, com 24h de duração cada uma, de diferentes indivíduos mantidos em condições experimentais idênticas. Esse tipo peculiar de série temporal é aceito devido à característica eussocial, que resulta em alta similaridade entre operárias de uma mesma colônia, de idade e atividade semelhantes. Essa metodologia já foi aplicada em um estudo com formigas (Takahashi-Del-Bianco *et al.*, 1992).

Análise estatística

Para detectar ritmos biológicos e definir o(s) período(s) foi aplicado o periodograma do qui-quadrado para cada série temporal (Sokolove e Bushell, 1978). O periodograma do qui-quadrado envolve o cálculo de taxas de variância (Q_p). Cada valor de período é associado a um valor de Q_p , e sua significância é determinada por um teste baseado em uma distribuição qui-quadrado (Sokolove e Bushell, 1978; Refinetti, 1993). Os periodogramas foram divididos em duas faixas de período: faixa ultradiana (4 a 18h) e faixa circadiana (18 a 30h). As análises foram efetuadas com nível de significância 0,05.

A partir dos dados dos periodogramas, foi definida a potência do principal componente ultradiano e do principal componente circadiano de cada série temporal. A definição dos valores de potência foi utilizada para comparar as características rítmicas dos diferentes grupos de operárias e os resultados obtidos no inverno e na primavera. As potências foram calculadas pela diferença entre os valores de Q_p no pico e na linha de significância do componente rítmico (Jenni *et al.*, 2005; ver figura 6 em Resultados).

A fim de comparar a ritmicidade circadiana dos grupos de operárias nas duas estações do ano, foi aplicado o método Cosinor (Nelson *et al.*, 1979), com nível de significância (α) de 0,05. O Cosinor ajusta a série temporal a uma curva coseno com período de 24h, definindo parâmetros do ritmo como mesor (valor médio), acrofase (ângulo de fase do valor máximo da função coseno) e amplitude (Halberg *et al.*, 1972). Os parâmetros rítmicos dos grupos foram então comparados, verificando se o intervalo de confiança desses parâmetros se sobrepõem. A não sobreposição significa que há uma diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros, com valor $p < 2\alpha$ (Silva *et al.*, 2003).

Todos os procedimentos estatísticos foram aplicados utilizando o programa El Temps (Antonio Díez-Noguera, 1999).

Dados complementares

Considerando que os grupos de operárias i e ii eram alocados em tarefas na região da cria, optou-se por realizar observações sobre o POP de *M. quadrifasciata*. As observações foram feitas por 3 dias (19 a 22 de dezembro de 2005), de hora em hora, com registro do número de células em construção e o estágio de construção de cada célula. O estágio de construção foi caracterizado usando o critério proposto por Camilo-Atique (1974).

Em *M. quadrifasciata* os favos são horizontais, envoltos por invólucro (Michener, 2000). Os processos de construção de células e aprovisionamento são do tipo sucessivo (Zucchi *et al.*, 1999),

e as operárias possuem ovários funcionais, efetuando posturas mesmo em colônias com rainha fisogástrica (Beig *et al.*, 1985; Boleli, 2000).

Sabe-se que em meliponíneos do gênero *Frieseomelitta* há um ciclo diário de oviposições pela rainha, sendo que o número de oviposições varia conforme a fase do dia (Bellusci, 2003; Teixeira, 2003). As observações visaram definir os intervalos entre os episódios de oviposição pela rainha e pelas operárias de *M. quadrifasciata*, bem como possíveis variações da amplitude dos episódios. Estes dados eram importantes para tentar estabelecer relações entre os ritmos metabólicos encontrados nas operárias, as atividades que exercem na colônia e a frequência de posturas.

RESULTADOS

As operárias dos três grupos etários considerados neste trabalho apresentaram comportamento bastante distinto. Observações prévias mostraram que as operárias recém-emergidas (24 a 48h de vida, grupo i), inseridas em colônia, permaneceram sobre os favos, em geral imóveis ou caminhando lentamente. As de idade média (10 a 15 dias, grupo ii) foram localizadas tanto na região de cria quanto nos potes de alimento, exercendo tarefas como limpeza e reparo dos favos e potes. Já as forrageadoras (mais de 25 dias, grupo iii) foram coletadas na entrada das colônias, quando retornavam do campo com pólen ou barro. O estabelecimento dos três grupos etários, portanto, permitiu o estudo de operárias alocadas em tarefas relacionadas às três principais regiões de uma colônia: células da cria, potes de alimento e túnel de entrada.

O grupo i foi sub-dividido em dois grupos, sendo que um deles consistia em operárias inseridas em uma colônia por 24h e o outro, em operárias isoladas, que nunca tiveram contato com uma colônia. A comparação entre os dados dos dois sub-grupos i pode fornecer indícios do papel do contato e/ou proximidade da rainha nos padrões rítmicos das operárias jovens. Para este grupo, os dados foram agrupados de acordo com os sub-grupos: uma série temporal para as inseridas em colônia e uma série para as isoladas, independente do número total de séries experimentais.

Durante o inverno, as colônias apresentaram queda na quantidade de favos e potes de alimento, e redução pronunciada no número de saídas para forrageamento. As operárias reduziram também a atividade locomotora, permanecendo imóveis principalmente sobre as células de cria. Houve igualmente redução dos episódios de postura pela rainha. Essa diminuição na atividade geral da colônia e no número de células de cria dificultou a retirada de favos para marcação de operárias e a coleta de forrageadoras, motivo pelo qual o número de séries temporais relativas ao inverno é menor do que aquele relativo à primavera.

No interior das câmaras metabólicas, as operárias dispunham de espaço suficiente para caminhar. As recém-emergidas permaneceram em geral imóveis, enquanto as de idade média

caminharam com maior frequência. As forrageadoras foram as que apresentaram atividade locomotora mais intensa, chegando a dar pequenos vôos no interior das câmaras.

Os dados obtidos nos experimentos de respirometria refletem os ritmos das operárias em livre-curso, ou seja, os ritmos endógenos. Considerando que o período dos ritmos endógenos (τ) difere de 24h, tradicionalmente os dados são apresentados em gráficos nos quais a abscissa corresponde a um ciclo de duração igual a τ . Neste trabalho, porém, as séries temporais foram montadas pelo agrupamento de séries de diferentes indivíduos. Como τ pode apresentar variações interindividuais (Pittendrigh e Daan, 1976), optou-se por plotar os dados em relação ao horário do relógio tradicional (abscissas de 24h), garantindo que todos os gráficos tenham abscissas equivalentes, o que permite melhor comparação entre os dados das diferentes operárias (figuras 5 a 19).

Em uma análise descritiva, os plexogramas (figura 5) mostram que o consumo médio de oxigênio é menor no grupo i, aumentando de acordo com o aumento da idade. Embora a atividade geral da colônia tenha sofrido uma redução no inverno, apenas o grupo ii apresentou consumo médio de oxigênio maior na primavera. Mesmo com a manutenção dos valores de amplitude, em todos os grupos as curvas são mais definidas na primavera, com menores valores de erro-padrão do que no inverno.

As análises de periodograma do qui-quadrado mostraram ritmicidade significativa em todos os grupos, nas duas estações do ano (figuras 6 a 19, tabela 2). No entanto, uma comparação entre os gráficos que mostram o consumo de oxigênio de cada operária, apresenta algumas discrepâncias (figuras 6 a 19), indicando que algumas operárias encontravam-se em fases distintas do ciclo no horário de início dos experimentos. Apesar do aparente inconveniente desta falta de concordância, deve-se lembrar que diferentes fases em indivíduos isolados é uma comprovação, ainda que indireta, de que o ritmo respiratório das operárias estava se expressando em livre-curso.

No inverno, foram detectadas variações acentuadas nos valores de τ dos grupos ii e iii, sendo que na primavera os valores foram semelhantes. A potência espectral também foi maior nas séries da primavera em relação ao inverno, exceto para o grupo i (tabela 2).

Além da ritmicidade circadiana, o periodograma do qui-quadrado apontou períodos de faixa ultradiana em todos os grupos, nas duas estações (figuras 6 a 19). Esses períodos variaram de 12 a 18h, apresentando potência espectral bastante variável, porém sempre inferior à potência espectral do período circadiano (tabela 2).

Os dados obtidos por observação do POP, analisados por periodograma do qui-quadrado, mostraram que as atividades de construção de células da cria e de oviposição apresentam um padrão rítmico. As análises detectaram em ambos processos, ritmos significantes na faixa de 24 horas e outros na faixa ultradiana (figura 20 e 21, tabela 3). A ocorrência de frequências semelhantes nos

ritmos respiratório e de atividade das operárias dos grupos i e ii indica que o consumo de oxigênio no indivíduo isolado mantém o padrão rítmico característico das tarefas relacionadas ao POP.

Calculando a razão entre a potência do principal componente ultradiano e o principal circadiano (figura 21), nota-se que o período circadiano é sempre mais pronunciado (valores sempre menores que 1). O grupo iii é o que apresenta menor razão ultradiano/circadiano. Em relação às estações do ano, a razão entre as potências é reduzida pela metade no grupo i durante a primavera, enquanto nos grupos ii e iii mantém-se aproximadamente a mesma.

Figura 6. Dados do grupo i, no inverno. Operárias isoladas da colônia. Volume de oxigênio consumido por cada operária ($ml \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$), de acordo com o horário. Abaixo, periodogramas do qui-quadrado: taxa de variância (Q^2) pelo período (minutos). Períodos de faixa ultradiana (esquerda) e faixa circadiana (direita). Em destaque o valor correspondente a potência espectral do principal componente circadiano.

Figura 7. Dados do grupo i, no inverno. Operárias inseridas por 24h em uma colônia. Volume de oxigênio consumido por cada operária ($ml \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$), de acordo com o horário. Abaixo, periodogramas do qui-quadrado, faixa ultradiana (esquerda) e faixa circadiana (direita).

Figura 8. Dados do grupo ii, no inverno. Volume de oxigênio consumido por cada operária, de acordo com o horário. Abaixo, periodogramas do qui-quadrado, faixa ultradiana (esquerda) e faixa circadiana (direita).

Figura 9. Segunda série de dados do **grupo ii, no inverno**. Volume de oxigênio consumido por cada operária, de acordo com o horário. Abaixo, periodogramas do qui-quadrado, faixa ultradiana (esquerda) e faixa circadiana (direita).

Figura 10. Dados do grupo iii, no inverno. Volume de oxigênio consumido por cada operária, de acordo com o horário. Abaixo, periodogramas do qui-quadrado, faixa ultradiana (esquerda) e faixa circadiana (direita).

Figura 11. Segunda série de dados do **grupo iii, no inverno**. Volume de oxigênio consumido por cada operária, de acordo com o horário. Abaixo, periodogramas do quadrado, faixa ultradiana (esquerda) e faixa circadiana (direita).

Figura 12. Dados do grupo i, na primavera. Operárias isoladas da colônia. Volume de oxigênio consumido por cada operária, de acordo com o horário. Abaixo, periodogramas do qui-quadrado, faixa ultradiana (esquerda) e faixa circadiana (direita).

Figura 13. Dados do **grupo i**, na **primavera**. Operárias inseridas por 24h em uma colônia. Volume de oxigênio consumido por cada operária, de acordo com o horário. Abaixo, periodogramas do qui-quadrado, faixa ultradiana (esquerda) e faixa circadiana (direita).

Figura 14. Dados do **grupo ii, na primavera**. Volume de oxigênio consumido por cada operária, de acordo com o horário. Abaixo, periodogramas do qui-quadrado, faixa ultradiana (esquerda) e faixa circadiana (direita).

Figura 15. Segunda série de dados do **grupo ii, na primavera**. Volume de oxigênio consumido por cada operária, de acordo com o horário. Abaixo, periodogramas do quadrado, faixa ultradiana (esquerda) e faixa circadiana (direita).

Figura 16. Terceira série de dados do **grupo ii, na primavera**. Volume de oxigênio consumido por cada operária, de acordo com o horário. Abaixo, periodogramas do quadrado, faixa ultradiana (esquerda) e faixa circadiana (direita).

Figura 17. Dados do grupo iii, na primavera. Volume de oxigênio consumido por cada operária, de acordo com o horário. Abaixo, periodogramas do qui-quadrado, faixa ultradiana (esquerda) e faixa circadiana (direita).

Figura 18. Segunda série de dados do grupo iii, na primavera. Volume de oxigênio consumido por cada operária, de acordo com o horário. Abaixo, periodogramas do quadrado, faixa ultradiana (esquerda) e faixa circadiana (direita).

Figura 19. Terceira série de dados do **grupo iii, na primavera**. Volume de oxigênio consumido por cada operária, de acordo com o horário. Abaixo, periodogramas do qui-quadrado, faixa ultradiana (esquerda) e faixa circadiana (direita).

Tabela 2. Periodograma do qui-quadrado: período endógeno (τ , em horas) de cada série temporal e correspondente potência espectral (entre parênteses).

		INVERNO		PRIMAVERA	
		circadiano	ultradiano	circadiano	ultradiano
Grupo i	Série 1 (isoladas da colônia)	23,83 (21)	15,91 (10,34)	28,08 (4,89)	16,5 (0,99)
	Série 2 (inseridas em colônia)	23,83 (20,92)	12 (6,05)	23,83 (20,19)	17,16 (4,34)
Grupo ii	Série 1	23 (7,47)	18 (1,22)	24,08 (48,06)	15,91 (10,02)
	Série 2	24,08 (24,35)	15,16 (8,64)	24,08 (13,1)	15,66 (2,46)
	Série 3	-	-	24,08 (24,2)	18 (1,38)
Grupo iii	Série 1	26,75 (14,94)	13,25 (2,5)	24,08 (29,91)	16 (4,61)
	Série 2	28,08 (16,91)	16,66 (0,68)	24,08 (39,93)	12,08 (2,39)
	Série 3	-	-	24,83 (19,37)	12,75 (2,48)

Tabela 3. Dados complementares. Períodos ultradianos e respectivas potências espectrais, definidas por periodograma do qui-quadrado.

	Colônia 1		Colônia 2	
	circadiano	ultradiano	circadiano	ultradiano
Número de células em construção	25 (24,48)	12,6 (19,26)	24,08 (29,37)	15 (14,21)
Número de oviposições	24,08 (38,58)	16,08 (28,36)	28,5 (32,39)	11,08 (22,95)

Os parâmetros dos ritmos circadianos encontrados foram analisados pelo método Cosinor (figura 22). Os valores de mesor e amplitude evidenciam as diferenças entre os grupos i e iii, sendo que o grupo ii apresenta valores intermediários.

No caso da acrofase, por outro lado, há uma pronunciada sobreposição entre os intervalos de confiança, com valores de aproximadamente 900 a 1100 minutos. Considerando que os experimentos foram iniciados sempre às 16:00h, esses valores de acrofase referem-se aproximadamente aos horários entre 07:00 e 10:00h (esse horário de pico de consumo de oxigênio é também evidente na figura 5).

Em relação às estações do ano, nota-se que houve um aumento nos valores de mesor e amplitude na primavera em comparação ao inverno, sendo o aumento mais pronunciado para o grupo ii. A acrofase manteve-se semelhante nas duas estações, com valores ao redor dos 1000 minutos (ou 16,67h).

DISCUSSÃO

A complexidade organizacional, característica de uma colônia eussocial, depende das diferenças funcionais e comportamentais presentes entre as castas e entre as operárias regidas pela divisão de trabalho. O processo ontogenético é, então, essencial à coordenação das atividades e organização de uma colônia, por estar envolvido na determinação das tarefas a serem exercidas pelas operárias, conforme a idade.

As características da arquitetura de uma colônia, associadas a divisão de trabalho, resultam em tarefas bastante distintas exercidas pelas operárias de diferentes idades. As diferentes tarefas envolvem diferenças no comportamento, fisiologia e, também, nos parâmetros rítmicos das operárias. Por conseguinte, a organização e manutenção de uma colônia depende do ajuste e acoplamento dos parâmetros rítmicos de cada indivíduo.

O componente circadiano

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam que operárias de *Melipona quadrifasciata* apresentam ritmicidade circadiana no consumo de oxigênio. Os ritmos circadianos foram encontrados em três fases distintas do desenvolvimento pós-embrionário, mostrando que os ritmos circadianos estão presentes nas operárias desde a idade de 24-48h.

Em outro Meliponini, *Scaptotrigona aff. depilis*, Giannini (1998) já havia encontrado fortes indícios da presença de circadianos em operárias jovens. Nesse trabalho, os ritmos circadianos também foram detectados no consumo de oxigênio, comprovando a ritmicidade em operárias alocadas em tarefas relacionadas aos favos de cria. Estas evidências estabelecem uma diferença básica entre a ontogênese do sistema circadiano nos Apini e nos Meliponini. Nos Apini, diversos autores (Spangler, 1972; Moore *et al.*, 1998; revisões em Moore, 2001 e Elekonich e Roberts, 2005), afirmam que operárias jovens são arrítmicas para frequências circadianas, que surgem mais tarde no desenvolvimento pós-embrionário. Nas operárias jovens de *M. quadrifasciata*, por outro lado, componentes circadianos e ultradianos estão presentes simultaneamente e com potências altas desde os primeiros dias de vida adulta.

Apesar de ainda ser prematura uma tentativa de explicação para as diferenças no processo ontogenético da ritmicidade circadiana entre Meliponini e Apini, pode-se formular algumas hipóteses:

1. Diferentes resultados para diferentes metodologias.

A existência de ritmos circadianos desde o início da vida adulta dos Meliponini foi comprovada por experimentos de respirometria, utilizando operárias individualmente isoladas. Os experimentos realizados com Apini consideram a atividade locomotora, ou são baseados em observações de abelhas marcadas no interior das colônias (Spangler, 1972; Free *et al.*, 1992; Crailsheim *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 1998).

Estudos realizados com duas outras espécies de Meliponini, *Frieseomelitta duoderleini* e *F. varia*, demonstraram que o período de oviposição da rainha impõe, em ambas espécies, o ritmo de atividade das operárias jovens, detectado na atividade de construção de células da cria (Bellusci, 2003). Tentativas de deslocar a fase deste ritmo falharam, numa demonstração de que sua natureza não é comparável à dos ritmos circadianos (Oda *et al.*, submetido). Assim, no aspecto da atividade locomotora de operárias no interior da colônia, os Meliponini, tal como ocorre em Apini, também não apresentam ritmos circadianos.

As operárias mais jovens de *M. quadrifasciata* apresentam atividade locomotora e metabolismo baixos em relação às forrageadoras (neste estudo, o consumo médio de oxigênio do grupo i foi da ordem de 0,035 ml. g⁻¹. min⁻¹

, do grupo iii em torno de 0,5 ml. g⁻¹. min⁻¹, figura 5). Os estudos descritivos da divisão de trabalho também indicam que as operárias recém-emergidas permanecem imóveis e em atividade de auto-limpeza durante a maior parte do tempo, assumindo tarefas como reparos nas células de cria após alguns dias de vida (Kerr e Santos Neto, 1956; Sommeijer, 1984).

Com isto, pode-se admitir que a sensibilidade do equipamento de detecção de atividade locomotora pode interferir nos resultados; atividades como auto-limpeza e movimentação das antenas podem não ser detectados. É preciso considerar também que, sendo obtidos com outras finalidades, dados sobre a atividade locomotora não são índices confiáveis do nível de atividade metabólica das operárias mais jovens.

2. Diferenças na bionomia dos grupos.

As diferenças entre os resultados de ontogênese de Meliponini e Apini referem-se principalmente à presença de frequências circadianas nas operárias recém-emergidas. Em ambas as tribos, essas operárias são alocadas em tarefas relacionadas a construção, manutenção e aprovisionamento de células de cria e alimentação da rainha (Winston, 1987; Wille, 1983).

Nos Meliponini, essas tarefas são conhecidas como POP, sendo que cada célula é utilizada apenas uma vez (portanto o processo de construção de células é contínuo e essencial para que as oviposições ocorram), e o aprovisionamento é em massa (não há contato entre os adultos e a forma imatura durante o desenvolvimento embrionário). Por outro lado, nos Apini cada célula é utilizada diversas

vezes, e o aprovisionamento é progressivo, sendo necessário que as operárias jovens alimentem progressivamente as larvas em desenvolvimento, até o estágio de pupa, quando as células são fechadas (Sakagami, 1982).

Em termos de organização temporal, pode-se prever que existam diferenças, entre Meliponini e Apini, na sincronização das atividades e interação operárias/rainha - embora nas duas tribos a comunicação e interação sejam igualmente intensas e essenciais para a manutenção das células e oviposições. Por exemplo, nos Meliponini a rainha faz a postura em uma célula aprovisionada, enquanto que nos Apini, a postura ocorre em uma célula vazia. A seqüência aprovisionamento, postura e operculação da célula depende de uma interação rainha/operárias perfeitamente sincronizada, sendo os intervalos entre os diferentes processos rigorosamente obedecidos. Assim, é possível que, para os Meliponini, a existência precoce de marcadores temporais endógenos seja fator essencial para a organização da colônia e, em especial, do POP.

Variações nos Parâmetros Circadianos

A ontogênese da ritmicidade envolve não somente a determinação do momento de surgimento dos ritmos circadianos, mas também modificação de parâmetros como período, fase, amplitude e composição de frequências (Andrade *et al.*, 2003).

O grupo i foi subdividido em operárias isoladas da colônia e operárias inseridas na colônia por 24h, antes dos experimentos. Os resultados indicaram valores de τ e potências semelhantes, exceto para as operárias isoladas na primavera, sendo difícil explicar o efeito do contato das operárias com a colônia sobre os ritmos encontrados. Os dados obtidos pelo Cosinor, no entanto, indicaram que o desvio-padrão da acrofase é maior nas operárias isoladas em relação às operárias inseridas na colônia. Esse é um indício de que o contato com os favos, operárias e rainha promove, em 24h, um ajuste de fase do ritmo de consumo de oxigênio, ou seja, esta é mais uma evidência de que o ciclo social é um *Zeitgeber* para as operárias do grupo i.

A metodologia utilizada neste trabalho foi medir o consumo de oxigênio de operárias individualmente isoladas, por 24h, e montar as séries temporais, agrupando as séries de 24h dos diferentes indivíduos. Dessa forma, cada valor de τ obtido por periodograma do qui-quadrado consiste em um τ resultante, calculado a partir dos diferentes valores de τ dos diferentes indivíduos. Em cinco espécies diferentes de roedores noturnos, Pittendrigh e Daan (1976) mostraram que há uma variação de τ entre indivíduos de uma mesma espécie; em alguns casos, a diferença desses valores para indivíduos co-específicos era maior que a diferença encontrada entre indivíduos de espécies distintas. Ainda assim, os valores de τ aqui obtidos para os três grupos (em especial na primavera para os grupos ii e iii) são bastante próximos ou mesmo semelhantes, indicando características bastante conservadas do τ de *M. quadrifasciata*.

Considerando que a variação interindividual de τ é pequena nesta espécie, as diferenças encontradas nos gráficos de consumo de oxigênio por horário indicam que, estando em livre-curso, num mesmo horário, os indivíduos estavam em fases distintas de seus ciclos circadianos. Isso explica os gráficos simétricos em relação ao eixo do horário.

Entre os parâmetros dos ritmos circadianos, definidos pelo método Cosinor, o que apresentou maior variação foi a amplitude do consumo de oxigênio. O grupo i (operárias recém-emergidas) exibiu valores de amplitude aproximadamente dez vezes menores que os valores do grupo iii (forrageadoras), sendo os valores do grupo ii intermediários. Françoso Jr (1999) estudou o metabolismo aeróbico de *Melipona bicolor*, e atribuiu o aumento no consumo de oxigênio ao longo da vida a fatores genéticos, independente de mudanças relacionadas às maiores demandas energéticas decorrentes da atividade de forrageamento. O aumento do consumo de oxigênio, portanto, acompanha o desenvolvimento pós-embriônico das operárias, assim como a intensificação da pigmentação (Sakagami, 1982), incremento da atividade locomotora (Kerr e Santos Neto, 1956), mudança no volume da neurópila (Menzel, 2001) e nos níveis de octopamina e hormônio juvenil (Schulz e Robinson, 1999). Sendo decorrente da ontogênese pós-embriônica, esta propriedade de aumentar a taxa respirométrica antes de assumir a função de forrageadora mostra uma antecipação do processo de adequação do organismo. Desta forma, ao atingir a idade para executar vôos de forrageamento, a operária já terá as características respiratórias adequadas para a tarefa.

Os componentes ultradianos

Todos os grupos estudados mostraram ritmicidade na faixa circadiana e também na ultradiana, esta última com períodos variando entre 12 e 18h (tabela 2). Analisando a composição de frequências (figura 21), nota-se que para todos os grupos a potência espectral do período circadiano é maior em relação ao ultradiano. Em alguns animais (coelhos, por exemplo; Jilge, 1993) há uma consolidação de um ritmo circadiano a partir de ritmos ultradianos iniciais. Em *M. quadrifasciata* não foi observada essa mudança na composição de frequências: a ritmicidade circadiana já está consolidada em operárias com 24-48h de vida, e as frequências ultradianas mantêm-se até a fase de forrageadoras.

Os processos de construção de células e oviposição apresentaram ritmos diário e ultradianos, sendo que a proporção da potência ultradiana em relação a diária foi alta (em torno de 0,5 para a construção de células e 0,7 para oviposições). Essas duas atividades podem estar relacionadas aos períodos ultradianos encontrados nas operárias, em especial nas operárias recém-emergidas (único grupo em que a razão ultradiano/circadiano alcançou valor próximo a 0,5). Sabe-se que as operárias jovens são fortemente influenciadas pela rainha e sua atividade de oviposição, e que mesmo as forrageadoras podem responder a alguns feromônios liberados pela rainha (Moritz e Sakofski, 1991; Whiffler e Hepburn, 1991; Le Conte *et al.*, 2001; Bellusci, 2003).

O significado dos ritmos biológicos que não têm contraparte em um ciclo ambiental é bastante discutido e controverso na cronobiologia (Hastings *et al.*, 1991). No caso dos Meliponini, porém, seu sentido parece ser bastante evidente. Grande parte das frequências ultradianas, especialmente nas forrageadoras, deve estar relacionada a funções fisiológicas e é descrita como relógios simples, ritmos com propriedades físicas diferentes daquelas dos circadianos (Oda *et al.*, 2000). Frequências ultradianas nas operárias jovens, por outro lado, parecem estar relacionadas ao ciclo ovariano da rainha. Ainda não há um estudo que comprove a existência de ritmos de secreção de feromônios pela rainha, mas se estes ritmos existirem, é muito provável que também sejam importantes agentes de arrastamento da atividade das operárias.

O componente sazonal

Os insetos sociais, em colônias perenes, coordenam o crescimento e desenvolvimento com a fase do ano em que as condições são favoráveis. Essa coordenação depende da percepção e resposta às pistas ambientais, por meio de comunicação entre os indivíduos da colônia ou por ritmos endógenos (Tauber *et al.*, 1986). O ritmo sazonal endógeno proporciona à espécie a possibilidade de preparar-se antecipadamente para a estação que lhe é adversa. Mudanças nos patamares metabólicos acontecem antes que as condições ambientais se tornem não permissivas. A exemplo do que ocorre com os ritmos circadianos, o sazonal endógeno também é arrastado por sinais ambientais, representados por mudanças climáticas ou condições bióticas. Roubik (1982), por exemplo, relacionou as atividades de coleta de alimento e produção de novas células de cria em *Melipona favosa* e *M. fulva* à abundância sazonal da floração.

A comparação dos resultados obtidos para o inverno e para primavera indica que durante a primavera os ciclos de consumo médio de oxigênio são mais claros, com valores menores de desvio-padrão e amplitude maior. As forrageadoras, no entanto, não mostraram aumento nos valores de amplitude na primavera. O resultado é inesperado, no entanto, na época da tomada de dados (início da primavera) a temperatura ambiente ainda estava baixa. Sabe-se que a temperatura é o principal agente modificador da expressão rítmica sazonal (para maiores detalhes, ver Saunders, 2002) e, portanto, seria necessária nova tomada de dados em outro ano em que a primavera apresentasse temperatura mais elevada.

Em um estudo com *Frieseomelitta varia*, observações mensais, durante dois anos, indicaram que o número de células em construção apresenta um padrão sazonal que se repete ano a ano. A atividade de vôo das forrageadoras, por outro lado, exibe uma variação conforme o mês, mas o padrão não é repetido no segundo ano, e não há uma relação clara entre os padrões anuais da atividade na cria e a atividade de vôo (Teixeira *et al.*, 2005). Considerando que neste trabalho a variação na amplitude de consumo de oxigênio foi observada apenas para as recém-emergidas e operárias de idade média, as evidências apontam para estratégias sazonais relacionadas à reprodução (oviposição) e ao desenvolvimento. Esta hipótese é corroborada pelo trabalho de Ribeiro (2002), que

observou uma interrupção nos processos de construção de células e oviposição em colônias de *Plebeia remota*, durante o outono-inverno. Estratégias sazonais desse tipo ocorrem em colônias de formigas tropicais, em que as atividades de forrageamento e movimentação no ninho são mantidas ao longo do ano, mas a reprodução exhibe um ritmo sazonal. O número de oviposições e a proporção operárias/formas reprodutoras mudam conforme a estação do ano, e há diapausa das formas larvais (Raignier *et al.*, 1974 *apud* Tauber *et al.*, 1986).

A redução do metabolismo no inverno, com diminuição dos níveis de consumo de oxigênio é um indício de diapausa (Tauber *et al.*, 1986; Saunders, 2002). De qualquer forma, são necessários experimentos em que as colônias sejam expostas a condições controladas de fotoperiodismo e de temperatura para esclarecer se as operárias entram realmente em diapausa, e qual é o fator que a desencadeia.

Como consequência da divisão de trabalho centrífuga nos Meliponini, as operárias mais jovens, assim como a rainha, permanecem no interior do ninho, onde a temperatura é estável e controlada e não há incidência de luz do ambiente externo. Se as operárias jovens são alocadas nas tarefas relacionadas com a reprodução, e as forrageadoras não mostram sinais de um padrão sazonal, é difícil inferir qual o possível mecanismo de medição de tempo envolvido na estratégia sazonal adotada por essas abelhas.

Influência da socialidade na organização temporal da colônia

Observações do comportamento da rainha e operárias jovens, com o registro dos episódios de construção de células e de oviposição foram realizadas para tentar esclarecer o significado dos outros ritmos detectados na respirometria. Isto porque, além dos circadianos, as operárias apresentaram também ritmos de frequência ultradiana, que poderiam estar relacionados a atividades do POP. As análises destes dados complementares por periodograma do qui-quadrado mostraram que os processos de construção de células e posturas de *M. quadrifasciata* apresentam ritmicidade diária, o que condiz com a ritmicidade circadiana das operárias. Em *Frieseomelitta varia*, a construção de células também ocorre ao longo das 24h, com uma variação diária (Teixeira, 2003). Resta esclarecer se o comportamento das operárias jovens na colônia segue um ritmo diário, e se a atividade é dividida entre as operárias em turnos, o que explicaria a distribuição de atividade ao longo das 24h. A observação de operárias marcadas individualmente na colônia contribuiria para a compreensão da influência da rainha nos parâmetros temporais dessas operárias.

De todo modo, a organização eussocial das colônias impõe uma influência social forte nos padrões temporais das operárias. Os resultados mostraram que, na primavera, as operárias de idade média e forrageadoras (grupo ii e iii) apresentam valores de τ semelhantes, e os três grupos apresentam valores próximos de acrofase (há sobreposição dos intervalos de confiança). Esses dados representam as características individuais dos ritmos endógenos, expressos por operárias em condição

de isolamento. Em condições naturais, estes ritmos são ajustados aos ciclos ambientais e às condições internas da colônia, colaborando para a manutenção dos padrões de divisão de trabalho, regida pela idade.

A influência social nos ritmos comportamentais e fisiológicos das operárias, de acordo com a divisão de trabalho, já foi comprovada nos Apini (Bloch *et al.*, 2002; Pankiw, 2004). Em *A. mellifera*, foram detectados padrões diferentes na expressão de genes temporais, mapeados através de modificações nos níveis de proteína (Bloch *et al.*, 1999). Apesar de não existirem dados sobre a expressão do genoma temporal em *M. quadrifasciata*, é possível que a regulação social tenha importância equivalente à que apresenta nos Apini. Os grupos denominados i, ii e iii neste trabalho exercem atividades bastante distintas, inclusive com diferenças temporais marcantes, como as atividades desempenhadas pelo grupo i na região do ninho, que se distribuem ao longo das 24h, e aquelas do grupo iii, o forrageamento, que fica restrito à fase clara do dia. Aparentemente não há contato direto entre as abelhas dos dois grupos no interior da colônia, mas ainda assim é possível que pistas indiretas, como a modificação do número de indivíduos no interior da colônia ao longo do dia (maior à noite porque as forrageiras não saem) (Bellusci, 2003), representem *Zeitgebers* sociais relevantes para a organização temporal interna do ninho.

Uma operária adulta passa por uma série de alterações comportamentais e fisiológicas, regidas pela divisão etária de trabalho, o que resulta em modificações sucessivas no significado de seus ritmos de frequência circadiana e ultradiana. Nas espécies de insetos em que foi estudada a ontogênese do sistema temporal, as formas mais jovens são tratadas como arrítmicas, por não apresentarem uma frequência circadiana significativa (Hadow *et al.*, 1961; Minis e Pittendrigh, 1968; Zimmerman, 1969). Nesses mesmos trabalhos, porém, pode-se observar que ritmos de frequência ultradiana são os preponderantes nas formas mais jovens e, ao longo do desenvolvimento, sua potência espectral diminui, sendo substituída pela frequência circadiana. Esta sucessão de frequências é observada em muitas outras espécies, inclusive em humanos (Kleitman e Englemann, 1953).

A manutenção da organização social depende, portanto, de sua integração com o desenvolvimento pós-embrionário dos ritmos das operárias. Cada grupo etário de operárias exerce tarefas que definem o contato social, o comportamento e o microclima a que estas operárias são expostas. Enquanto as mais jovens permanecem em um ambiente controlado e estável, próximas à rainha e suas atividades, as mais velhas saem da colônia e entram em contato com o ambiente externo. Todos esses fatores decorrentes da divisão de trabalho, sem dúvida, exercem influência nas características rítmicas das operárias. Ritmos ultradianos das operárias mais jovens (grupo i) são ajustados ao ritmo de oviposição da rainha. Seus componentes circadianos podem ser responsáveis pela adequação ao ambiente geral da colônia, em que a frequência circadiana se faz presente pelo ritmo de atividade/repouso das forrageadoras. Frequências ultradianas nos grupos ii e iii, por outro lado, estão possivelmente ligadas a funções fisiológicas.

CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que as operárias de *M. quadrifasciata* apresentam ritmicidade circadiana no consumo de oxigênio, em diferentes etapas do desenvolvimento pós-embrionário (24-48h de idade, 10-15 dias de idade e mais de 25 dias de idade – forrageadoras). O processo de ontogênese da ritmicidade circadiana envolve principalmente mudanças na amplitude dos ritmos de consumo de oxigênio, que aumenta conforme o aumento da idade.

Freqüências ultradianas significativas foram observadas em todas as operárias estudadas, sendo que a potência espectral em relação à freqüência circadiana foi maior para a idade de 24-48h. Nestas operárias mais jovens, é provável que a ritmicidade ultradiana esteja relacionada à atividade de oviposição da rainha. Já nas operárias mais velhas, ritmos ultradianos estão possivelmente associados à funções fisiológicas.

Os dados obtidos na primavera mostram ciclos de consumo médio de oxigênio mais claros em relação aos dados de inverno. Na primavera a amplitude do consumo de oxigênio foi maior, exceto para as forrageadoras, o que pode ser um indício de estratégias sazonais ligadas à atividade reprodutiva (POP).

Os componentes temporais rítmicos, associados aos componentes espaciais, são essenciais na manutenção e coordenação das atividades em uma colônia de abelhas eussociais. A execução de diferentes tarefas inter-relacionadas depende de uma coordenação precisa entre as operárias, organizadas por uma divisão de trabalho mediada pela idade. Dessa forma, o estudo da organização rítmica, associada ao polietismo etário, traz informações importantes para a compreensão da biologia de uma colônia eussocial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida G.F. 2004. Estudo de componentes rítmicos detectados na colônia de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Dissertação de Mestrado. FCCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Andrade M.M.M., L. Menna-Barreto e F. Louzada. 2003. Ontogênese da ritmicidade biológica. In: N. Marques e L. Menna-Barreto (orgs.), *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*: 247-267. 3ª ed. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Aschoff J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 25: 11-28.
- Aschoff J. 1988. Masking of circadian rhythms by Zeitgebers as opposed to entrainment. In: W.T.J.M., Hekken, G.A. Kerkhof e W.J. Rietveld (eds.), *Trends in Chronobiology*: 149-162. Pergamon Press, Oxford.
- Beig D., O.C. Bueno e T.J. Müller. 1985. Características dos alvéolos de cria e postura de operárias em *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hym., Apidae, Meliponinae). *Naturalia*, 10: 75-81.
- Bellusci S. 2003. Colônia de abelhas eussociais: modulação de ritmos com ênfase no processo de construção de células de cria e postura em duas espécies de abelhas sem ferrão, *Frieseomelitta doederleini* e *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae). Tese de doutorado. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Bellusci S. e M.D. Marques, 2001. Circadian activity rhythm of the foragers of a eusocial bee (*Scaptotrigona* aff. *depilis*, Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) outside the nest. *Biol. Rhythm Res.*, 32(2): 117-124.
- Bloch G., S.E. Fahrbach e G.E. Robinson. 1999. Age-related increase in PERIOD (PER) protein levels in the honey bee brain. *Soc. Neurosc. Abstr.*, 25: 1132.
- Bloch G., J.P. Sullivan e G.E. Robinson. 2002. Juvenile hormone and circadian locomotor activity in the honey bee *Apis mellifera*. *J. Ins. Physiol.*, 48: 1123-1131.
- Boleli I.C., Z.L.P. Simões e M.M.G. Bitondi. 2000. Regression of the lateral oviducts during the larval-adult transformation of the reproductive system of *Melipona quadrifasciata* and *Frieseomelitta varia*. *J. Morphol.*, 243: 141-151.
- Bourke A.F.G e N.R. Franks. 1995. *Social Evolution in Ants*. Princeton University Press, Princeton.
- Bünning E. 1967. *The Physiological Clock*. 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- Camilo-Atique C. 1974. Variabilidade do comportamento de *Melipona rufiventris rufiventris* (Hymenoptera, Apoidea). Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética e Matemática

Aplicada à Biologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

- Crailsheim K., N. Hrassnig e A. Stabentheiner. 1996. Diurnal behavioural differences in forager and nurse honey bees (*Apis mellifera carnica* Pollm). *Apidologie*, 27: 235-244.
- DeCoursey P. 2004. Overview of biological timing from unicells to humans. In: J.C. Dunlap, J.J. Loros e P.J. DeCoursey (eds.), *Chronobiology: Biological Timekeeping*: 3-26. Sinauer Associates, Sunderland.
- Denlinger D.L. 1986. Dormancy in tropical insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 31: 239-264.
- Dunlap J.C. 2004. Molecular biology of circadian pacemaker systems. In: J.C. Dunlap, J.J. Loros e P.J. DeCoursey (eds.), *Chronobiology: Biological Timekeeping*: 213-254. Sinauer Associates, Sunderland.
- Elekonich M.M. e S.P. Roberts. 2005. Honey bees as a model for understanding mechanisms of life history transitions. *Comp. Biochem. Physiol.*, 141(4): 362-371.
- Françoso Junior O. de A. 1999. Estudo comparativo do metabolismo aeróbico de *Melipona bicolor* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). Tese de doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Free J.B., A.W. Ferguson e J.R. Simpkins. 1992. The behaviour of queen honey bees and their attendants. *Physiol. Entomol.*, 17: 43-55.
- Frisch B. e J. Aschoff. 1987. Circadian rhythms in honeybees: entrainment by feeding cycles. *Physiol. Entomol.*, 12: 41-49.
- Frisch B. e N. Koeniger. 1994. Social synchronization of the activity rhythms of honeybees within a colony. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 35: 91-98.
- Fukuda H. 1983. The relationship between work efficiency and population size in a honeybee colony. *Res. Popul. Ecol.*, 25: 249-263.
- Giannini K.M. 1998. Interpretação do processo de aprovisionamento e oviposição de *Scaptotrigona aff. depilis* (Moure, 1942) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) segundo um enfoque cronobiológico. Dissertação de Mestrado. FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Giray T. e G.E. Robinson. 1994. Effects of intracolony variability in behavioral development on plasticity of division of labor in honey bee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 35: 13-20.

- Gomes F.R, J.G. Chaui-Berlinck, J.E.P.W. Bicudo e C.A. Navas. 2004. Intraspecific relationships between resting and activity metabolism in anuran amphibians: influence of ecology and behavior. *Physiol. Biochem. Zool.*, 77(2): 197-208.
- Gordon D.M. 1996. The organization of work in social insect colonies. *Nature*, 380: 121-124.
- Grosso A.F. e L.R. Bego, 2002. Labor division, average life span, survival curve, and nest architecture of *Tetragonisca angustula angustula* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Sociobiol.*, 40(3): 615-637.
- Haddow A.J., J.D. Guillelt e P.S. Corbet. 1961. Observations on the oviposition-cycle of *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Linnaeus) V. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 55: 343-356.
- Halberg F. 1959. Physiologic 24-hour periodicity, general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. *Z.Vitamin.-Hormon.-u Ferment-forsch.*, 10: 225-296.
- Halberg F. 1969. Chronobiology. *Ann. Rev. Physiol.*, 31: 675-725.
- Halberg F., E.A. Johnson, W. Nelson, W. Runge e R. Sothorn. 1972. Autorhythmometry – procedures for physiologic self-measurements and their analysis. *Physiol. Teacher*, 1: 1-11.
- Hastings J.W., B. Rusak e Z. Boulos. 1991. Circadian rhythms: the physiology of biological timing. In: C.L. Prosser (ed.), *Neural and Integrative Animal Physiology*: 435-546. 4th ed. John Wiley & Sons, New York.
- Heinrich B. 1974. Thermoregulation in endothermic insects. *Science* , 185:747-756
- Jenni O.G., T. Deboer e P. Achermann. 2005. Development of the 24-h rest-activity pattern in human infants. *Infant Behav. Develop.*, no prelo.
- Jilge B. 1993. The ontogeny of circadian rhythms in the rabbit. *J. Biol. Rhythms*, 8: 247-260.
- Kaiser W. 1988. Busy bees need rest, too. *J. Comp. Physiol.*, 163A:565-584.
- Kerr W.E. 1951. Bases para o estudo da genética de populações dos Hymenoptera em geral e dos Apinae sociais em particular. *Anais Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz*, 8: 219-314.
- Kerr W.E. e G.R. dos Santos Neto. 1956. Contribuição para o conhecimento da bionomia dos Meliponini. V. Divisão de trabalho entre operárias de *M. quadrifasciata quadrifasciata* Lep. *Ins. Soc.*, 3: 423-430.
- Kleitman, N. e T.G. Englemann. 1953. Sleep characteristics of infants. *J. Appl. Physiol.*, 7: 269-282.
- LeConte Y., A. Mohammadi e G.E. Robinson. 2001. Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 268: 163-168.

- Loher W. 1979. The effect of male calling on female locomotor activity of *Teleogryllus commodus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 79:383-390.
- Marques M.D., D. Golombek e C. Moreno. 2003. Adaptação temporal. In: N. Marques e L. Menna-Barreto (orgs.), *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*: 55-98. 3ª ed. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Marques N. e L. Menna-Barreto (orgs.). 2003. *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. 3ª ed. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Menna-Barreto L. 1991. O tempo biológico. *Bolm Psicol.*, 41(94/95): 1-3.
- Menna-Barreto L. 2003. O tempo na biologia. In: N. Marques e L. Menna-Barreto (orgs.), *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*: 25-29. 3ª ed. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Menzel R. 2001. Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn. Mem.*, 8: 53-62.
- Michener C.D. 1974. *The Social Behavior of the Bees. A Comparative Study*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.
- Michener C.D. 2000. *The Bees of the World*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Minis D.H. e C.S. Pittendrigh. 1968. Circadian oscillation controlling hatching: its ontogeny during embryogenesis of a moth. *Science*, 159: 534-536.
- Moore D. 2001. Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms. *J. Insect Physiol.*, 47: 843-857.
- Moore D. e M.A. Rankin. 1985. Circadian locomotor rhythms in individual honeybees. *Physiol. Entomol.*, 10: 191-197.
- Moore D. e M.A. Rankin. 1993. Light and temperature entrainment of a locomotor rhythm in honeybees. *Physiol. Entomol.*, 18: 271-278.
- Moore D., D. Siegfried, R. Wilson e M.A. Rankin. 1989. The influence of time of day on the foraging behavior of the honeybee *Apis mellifera*. *J. Biol. Rhythms*, 4: 305-325.
- Moore D., T. Giray e G.E. Robinson. 1996. Genotypic differences in the ontogeny of circadian rhythmicity in honey bees. *Soc. Neurosc. Abstr.*, 22: 151.

- Moore D., J.E. Angel, I.M. Cheeseman, S.E. Fahrbach e G.E. Robinson, 1998. Timekeeping in the honey bee colony: integration of circadian rhythms and division of labor. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 43: 147-160.
- Moore-Ede M.C., F.M. Sulzman e C.A. Fuller. 1982. *The Clocks that Time Us: Physiology of the Circadian Timing System*. Harvard University Press, Cambridge.
- Moritz R.F.A. e F. Sakofski. 1991. The role of the queen in circadian rhythms of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 29: 361-365.
- Moritz R.F.A. e P. Kryger. 1994. Self-organization of circadian rhythms in groups of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 34: 211-215.
- Nelson W., Y.L. Tong, J.K. Lee e F. Halberg. 1979. Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia*, 6: 305-323.
- Nogueira-Neto P. 1997. *Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. Editora Nogueirapis, São Paulo.
- Oda G.A., Caldas I.L., Piqueira J.R.C., Waterhouse J.M. e Marques M.D. 2000. Coupled biological oscillators in a cave insect. *J. Theor. Biol.*, 206: 515-524.
- Page T.L. 1985. Clocks and circadian rhythms. In: G.A. Kerkut e L.I. Gilbert (eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*: 577-652. Vol. 6. Pergamon Press, Oxford.
- Page T.L. 1989. Masking in invertebrates. *Chronobiol. Int.*, 6: 3-11.
- Page T.L. e G.D. Block. 1980. Circadian rhythmicity in cockroaches: effects of early post-embryonic development and ageing. *Physiol. Entomol.*, 5: 272-281.
- Pankiw T. 2004. Worker honey bee pheromone regulation of foraging ontogeny. *Naturwissenschaften*, 91: 178-181.
- Pittendrigh C.S. 1958. Perspectives in the study of biological clocks. In: A.A. Buzzati-Traverso (ed.), *Perspectives in Marine Biology*: 239-268. University of California Press, Berkeley.
- Pittendrigh C.S. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 25: 159-184.
- Pittendrigh C.S. 1981. Circadian systems: general perspective. In: J. Aschoff (org.), *Handbook of Behavioral Neurobiology – Biological Rhythms*: 57-80. Vol. 4. Plenum Press, New York.
- Pittendrigh, C.S e S. Daan. 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J. Comp. Physiol.*, 106A: 223-252.

- Proni E.A. e O.J.D. Macieira. 2004. Ritmo circadiano da taxa respiratória de *Tetragonisca angustula fiebrigi* (Schwarz), *T.a. angustula* (Latreille) e *Trigona spinipes* (Fabricius) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Rev. Bras. Zool.*, 21(4): 987-993.
- Refinetti R. 1993. Laboratory instrumentation and computing: comparison of six methods for the determination of the period of circadian rhythms. *Physiol. Behav.*, 54: 869-875.
- Ribeiro, M. de F. 2002. Does the queen of *Plebeia remota* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) stimulate her workers to start brood cell construction after winter? *Insectes Soc.*, 49: 38-40.
- Robinson G.E. 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Ann. Rev. Entomol.*, 37: 637-665.
- Rothe U. e W. Nachtigall. 1989. Flight of the honey bee. IV. Respiratory quotients and metabolic rates during sitting, walking and flying. *J. Comp. Physiol.*, 158B: 739-749.
- Roubik, D.W. 1982. Seasonality in colony food storage, brood production and adult survivorship: studies of *Melipona* in tropical forest (Hymenoptera: Apidae). *J. Kansas Entomol. Soc.*, 55(4): 789-800.
- Sakagami S.F. 1982. Stingless bees. In: H.R. Hermann (ed.), *Social Insects*: 361-423. Academic Press, New York.
- Sauer S., M. Kinkelin, E. Herrmann e W. Kaiser. 2003. The dynamics of sleep-like behaviour in honey bees. *J. Comp. Physiol.*, 189A: 599-607.
- Saunders D.S. 2002. *Insect Clocks*. 3rd ed. Elsevier Science, Amsterdam.
- Sehgal A., J. Price e M.W. Young. 1992. Ontogeny of a biological clock in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1423-1427.
- Schulz D.J. e G.E. Robinson. 1999. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age related changes in the mushroom bodies. *J. Comp. Physiol. A*, 184: 481-488.
- Simões D. e L.R. Bego, 1991. Division of labor, average life span and life table in *Nannotrigona* (*Scaptotrigona*) *postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Naturalia*, 16: 81-97.
- Silva A.A.B. 2003. Aspectos metodológicos da cronobiologia. In: N. Marques e L. Menna-Barreto (orgs.), *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*: 297-320. 3^a ed. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Sokolove P.G. e W.N. Bushell. 1978. The chi-square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J. Theor. Biol.*, 72: 131-160.

- Sommeijer M.J. 1984. Distribution of labour among workers of *Melipona favosa* F.: age-polyethism and worker oviposition. *Ins. Soc.*, 2: 171-184.
- Southwick E.E. e R.F.A. Moritz. 1987. Social synchronzation of circadian rhythms of metabolism in honeybees (*Apis mellifera*). *Physiol. Entomol.*, 12: 209-212.
- Spangler H.G. 1972. Daily activity rhythms of individual worker and drone heneey bees. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 66: 449-451.
- Steel C.G.H. e X. Vafopoulou. 2002. Physiology of circadian systems. In: D.S. Saunders (ed.), *Insect Clocks*. 115-188. 3rd ed. Elsevier Science, Amsterdam.
- Sullivan J.P., O. Jassim, S.E. Fahrbach e G.E. Robinson. 2000. Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. *Horm. Behav.*, 37: 1-14.
- Takahashi-Del Bianco M., A.A. Benedito-Silva, M.J.A. Hebling, N. Marques & M.D. Marques. 1992. Circadian oscillatory patterns of oxygen uptake in individual workers of the ant *Camponotus rufipes*. *Physiol. Entomol.*, 17: 377-383.
- Tauber M.J., C.A. Tauber e S. Masaki, 1986. *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford University Press, New York.
- Teixeira L.V. 2003. Aspectos temporais em colônias de *Frieseomelitta varia*: influência das estações do ano, hora do dia e clima nas atividades de construção de células e de vôo (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). Monografia de Bacharelado. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Teixeira L.V., A.M. Nevill, J.M. Waterhouse e M.D. Marques. 2005. Ritmos diário e sazonal na atividade de vôo e construção de células em colônias de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Anais do I Simpósio Brasileiro de Insetos Sociais, Belo Horizonte. (versão digital)
- Toma D.P., G. Bloch, D. Moore e G.E. Robinson. 2000. Changes in *per* mRNA levels in the brain and division of labor in honey bee colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 6914-6919.
- Underwood H.A., G.T. Wassmer e T.L. Page. 1997. Daily and seasonal rhythms. In: W.H. Dantzler (ed.), *Handbook of Physiology. A critical, comprehensive presentation of physiological knowledge and concepts*: 1697-1714. Vol. II. Oxford University Press, New York.
- Van Nerum K. e H. Buelens. 1997. Hypoxia-controlled winter metabolism in honeybees (*Apis mellifera*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 117A: 445-455.
- Whiffler L.A. e H.R. Hepburn. 1991. The queen in relation to wax secretion and comb building in honeybees. *J. Comp. Physiol. A*, 169: 209-214.

Wille A. 1983. Biology of the stingless bees. *Ann. Rev. Entomol.*, 28: 41-64.

Winston M.L. 1987. *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge.

Zimmerman W.F. 1969. On the absence of circadian rhythmicity in *Drosophila pseudoobscura* pupae. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.*, 136: 494-500.

Zucchi R., E.V. da Silva-Matos, F.H. Nogueira-Ferreira e G.G. Azevedo, 1999. On the cell provisioning and oviposition process (POP) of the stingless bees – nomenclature reappraisal and evolutionary considerations (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Sociobiol.*, 34(1): 65-86.