

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

**CARACTERIZAÇÃO DO RITMO DE
ATIVIDADE/REPOUSO EM
LIVRE-CURSO DE *SCAPTOTRIGONA AFF
DEPILIS* (MOURE, 1942) (HYMENOPTERA,
APIDAE, MELIPONINAE)**

Selma Bellusci

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto – USP, como
parte das exigências para a obtenção do
Título de MESTRE EM CIÊNCIAS
– Área: ENTOMOLOGIA

1998
RIBEIRÃO PRETO/SP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
"Campus" de Ribeirão Preto



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE SELMA BELLUSCI, APRESENTADA A FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, NO DIA 20 DE NOVEMBRO DE 1998.

COMISSÃO JULGADORA:


Prof. Dra. MIRIAN DAVID MARQUES (Orientadora)


Prof. Dr. RONALDO ZUCCHI

Prof. Dr. HAYO HANS WILLEM VELTHUIS

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

**CARACTERIZAÇÃO DO RITMO DE
ATIVIDADE/REPOUSO EM
LIVRE-CURSO DE *SCAPTOTRIGONA AFF
DEPILIS* (MOURE, 1942) (HYMENOPTERA,
APIDAE, MELIPONINAE)**

Selma Bellusci

Orientadora: Mirian David Marques

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras
de Ribeirão Preto – USP, como parte das
exigências para a obtenção do título de
MESTRE EM CIÊNCIAS – Área:
ENTOMOLOGIA.

1998
RIBEIRÃO PRETO/SP

Entre la noche y el día
Hay un territorio indeciso,
No es luz, ni sombra,
Es *tiempo*.

(Octavio Paz).

Dedico este trabalho a meus Pais (in memoriam) que através de seus ensinamentos, educação e carinho mostraram-me a beleza da vida.

Agradecimentos

À Profª Dra. Mirian David Marques, pela orientação, pela amizade, pela oportunidade de poder trabalhar em parceria e de colocar-me em contato com uma das áreas mais fascinantes, a Cronobiologia.

À Profª Dra. Luci Rolandi Bego, pela amizade, pelo apoio, pelas informações sobre o sistema biológico e pelo espaço ocupado durante este trabalho.

À Profª Dra. Zilá Luz Paulino Simões pelo apoio, incentivo e colaboração.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Zucchi pela amizade, disponibilidade e pela utilização dos recursos de seu laboratório.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo e ao Departamento de Biologia, pelas facilidades oferecidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da FFCLRP – USP, pela oportunidade.

Ao Sidney Mateus pela amizade, pela ajuda, pela disponibilidade, pelas idéias e pelo incentivo.

Ao Ari (Oficina de Eletrônica) pela confecção dos tubos de saída da colônia e pelas sugestões.

À Eunice Vieira da Silva Matos pela amizade, ajuda na edição e pelas sugestões.

À Giselle Garcia Azevedo pela amizade maravilhosa, pela disponibilidade nos momentos difíceis e pela ajuda.

Ao Mário Valentim Baio pela amizade e pela ajuda edição na utilização dos recursos computacionais.

Ao Prof. Dr. Evandro Camillo pela ajuda na impressão.

À Ursula e Hannelia pela amizade e auxílio com o summary.

À Katia Maria Gianinni pela amizade e apoio.

À Fernanda Helena, Maria Cristina e Fernando Noll e Lenira pela amizade, ajuda e apoio; ao Gabriel Melo pelo auxílio com as fotos.

Aos amigos do departamento pela amizade: Bartira, Patrícia Romano, Maria Lúcia, Rita, Andréia, Helen, Tânia, Carla, Vera, Maria Virgínia, Douglas, Mazza, Isabel, Paula, Laércio, José Carlos, Cidinha e à ex-funcionária Valdete.

Às secretárias da pós-graduação Inês, Elaine e Denise pela amizade e disponibilidade.

À Ana Karina e Ana Lúcia pela amizade e pelas horas divertidas dos almoços.

À minha grande amiga Samira Chahad pela companhia, pelo incentivo, pela ajuda e à minha querida amiga Sônia Höenen pela ajuda, pelas risadas, pelos mails explicativos.

Aos meus queridos amigos (pesquisadores, alunos e funcionários) do Museu de Zoologia – USP, que estiveram e estão comigo o tempo todo.

À Sônia Casari e ao Ricardo P. da Rocha pela grande amizade, pelo incentivo e pela ajuda nos momentos difíceis.

Aos amigos da casa 12: Jaqueline, Telma pela ajuda importantíssima na edição, Isabel, Myres, Aline, Gigio, Polaco, Vanderlei, Pedro, Samuel e César.

Aos Professores que contribuíram e continuam contribuindo para a minha formação.

À minha família. Ao meu querido tio Roberto Bellusci (*in memoriam*).

A todos que me auxiliaram de alguma forma.

ÍNDICE

	Pág.
I – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Aspectos Biológicos.....	1
1.1.1 Componentes do Ninho e Arquitetura.....	2
1.1.2 Breve Comentário sobre a Diferenciação de Castas.....	3
1.1.3 Forrageamento e Comunicação.....	5
1.2 – Aspectos Cronobiológicos.....	6
1.2.1 Ritmos em Insetos.....	9
1.2.2 Compensação da Temperatura.....	11
1.2.3 Mascaramento.....	12
II – OBJETIVOS.....	13
III – MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Experimento I.....	14
3.1.1 Coleta de Dados.....	15
3.1.2 Desenvolvimento de um Sistema de Tomada de Dados.....	16
3.2 Experimento II.....	19
3.2.1 Equipamento de Coleta de Dados – Descrição e Comentários	21
3.3 Análise Estatística – Cosinor.....	22
IV – RESULTADOS.....	23
4.1 Comportamentos Observados.....	23
4.1.1 Experimento I.....	24
4.1.2 Experimento II.....	25

4.2 Ritmo de Atividade.....	26
4.2.1 Experimento I.....	26
4.2.2 Experimento II.....	29
4.2.3 Registro Automático.....	38
V – DISCUSSÃO.....	39
5.1 Condições Experimentais.....	39
5.2 Ritmo de Atividade/Repouso.....	40
5.2.1 Ritmo em Livre Curso.....	42
5.2.1.1 Interferências Detectadas.....	43
5.2.1.2 Pós-Efeito do Arrastamento Prévio.....	43
5.2.1.3 Influência da Iluminação.....	44
5.2.1.4 Influência da Temperatura.....	45
5.2.1.5 Influência de Fatores Bióticos.....	46
5.3 Caracterização do Ritmo de Atividade de <i>S. aff depilis</i>	48
5.3.1 Livre-Curso.....	48
5.3.2 Arrastamento.....	49
VI – CONCLUSÕES.....	51
VII – RESUMO.....	52
VIII – SUMMARY.....	53
IX – GLOSSÁRIO	54
9.1 Termos Cronobiológicos.....	54
9.2 Símbolos.....	57
X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

I. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Biológicos

As subfamílias Meliponinae, Apinae, Bombinae e Euglossinae pertencem à família Apidae, sendo que Bombinae é primitivamente eusocial, Apinae e Meliponinae são altamente eusociais (MICHENER, 1974, 1990).

Os meliponíneos distinguem-se por apresentarem colônias grandes e perenes, diferenciação extrema de castas, inabilidade da rainha para formar solitariamente o ninho, arquitetura do ninho e sistemas de comunicação muito elaborados, armazenamento de grandes quantidades de alimento e sistemas de termorregulação altamente eficientes, caracteres estes compartilhados com os Apíneos (SAKAGAMI, 1982).

Com relação à morfologia, os meliponíneos apresentam ferrão vestigial; redução da asa anterior, bem como da venação e posição dorsal das glândulas de cera nas operárias. Apresentam *penicillum*, estrutura formada por uma escova de cerdas rígidas, localizada na margem apical externa da tíbia posterior, sendo reduzida ou ausente nos gêneros *Hypotrigona*, *Lestremelitta* e *Cleptotrigona*. (SAKAGAMI, 1982).

Os meliponíneos, de maneira geral, apresentam certas particularidades etológicas durante o processo de postura, tais como aprovisionamento massal, onde o alimento é depositado na célula, numa quantidade necessária para desenvolvimento do indivíduo, em seguida ocorre a postura da rainha e, posteriormente, a operculação de tal célula. Na maioria das espécies existem fortes interações entre a rainha e as operárias - sinais ritualizados de dominância - importantes no desencadeamento do processo de aprovisionamento e oviposição das células de cria (ZUCCHI, 1993).

O gênero *Scaptotrigona* pertence à tribo Trigonini, compreende abelhas de porte médio consideradas um dos exemplares mais robustos dos Meliponinae, possui alta densidade populacional e sua distribuição geográfica abrange as regiões tropical e subtropical, estendendo-se do México até o Rio Grande do Sul (NOGUEIRA-NETO, 1970), ou de acordo com MICHENER (1990), do México até a Argentina. Há registros de ninhos em árvores vivas, sendo freqüente a ocorrência de mais de um ninho da mesma espécie, bem como, o consórcio com outras espécies congêneres e com outras espécies de meliponíneos, entre elas, *Trigona*, *Ptilotrigona* e *Lestremelitta* em uma mesma árvore (CAMARGO, 1994).

Scaptotrigona depilis (MOURE, 1942) são abelhas de tegumento negro, consideradas muito agressivas conhecidas popularmente como “mandaguari”. Vivem geralmente dentro de ocos de árvores (NOGUEIRA-NETO, 1970).

1.1.1 Componentes do Ninho e Arquitetura

Em geral, nos ninhos dos meliponíneos o principal componente é o cerume. Este é composto de uma mistura de cera com própolis. A cera é secretada pelos indivíduos relativamente jovens através das glândulas existentes na região dorsal do abdômen, entre os segmentos enquanto que, a própolis é a resina vegetal proveniente das árvores e arbustos danificados ou perfurados por larvas de outros insetos. Em *Scaptotrigona* spp, este material moderadamente viscoso é coletado pelas abelhas forrageadoras e armazenado nos potes de alimento. Outro componente rico em própolis, é o batume (massa de cerume preparada pelas abelhas), que reveste o ninho (NOGUEIRA-NETO, 1997).

O túnel de entrada do ninho é feito de cerume e divide-se em interno e externo. O tubo externo do ninho de *Scaptotrigona* spp é caracterizado por apresentar um funil de cerume escuro com forma de trombeta, permanecendo aberto durante a noite, sendo que nas horas de atividade é "guardado" por um conjunto de operárias, o túnel de ingresso (interno) desemboca próximo ao favo, onde localizam-se as células de cria, feitas de cerume (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Os ninhos dos meliponíneos são construídos em locais fechados e protegidos. Podem ocupar cavidades pré-existentes de árvores, ou então, ninhos abandonados de formigas e cupins, ou ser subterrâneos (SAKAGAMI, 1982).

Colônias bem desenvolvidas mostram estratos de favos horizontais, concêntricos, do tipo completo e as células reais são maiores em relação às demais, localizando-se na periferia do favo (GIANNINI, 1993) (Figura 1).

Existe uma notável capacidade de termorregulação devido à estrutura do ninho (SAKAGAMI, 1982). A região onde é mantida a cria é envolta por várias camadas de invólucro, o que garante seu isolamento e a manutenção de uma temperatura mais elevada (ENGELS *et al.*, 1995).

Na periferia do favo localizam-se os potes de alimento. Geralmente são ovais, agrupados irregularmente e acumulam pólen e mel.

Também observam-se no ninho, pilares de cerume, servindo como 'andaimés' para ligar e fixar principalmente os favos de cria e potes de alimento. Além disso, há depósitos de detritos onde é acumulado lixo, sendo estes, depósitos provisórios, enquanto que o escutelo é uma massa de material de refugo (restos de casulo, abelhas mortas, dejetos e detritos), que se caracteriza por ser permanente e localizar-se na parte inferior do ninho (NOGUEIRA-NETO, 1997).



FIGURA 1: Vista do favo de cria de *Scaptotrigona* aff. *depilis*.

1.1.2 Breve Comentário Sobre a Diferenciação de Castas

As colônias consistem geralmente de uma rainha e um amplo número de operárias e machos, com uma clara divisão de trabalho entre as castas; as fêmeas são diplóides enquanto que os machos, haplóides (NOGUEIRA-NETO, 1997).

De acordo com os experimentos de DARCHEN & DELAGE (1970) realizados com *Trigona* spp, a determinação das castas está baseada na quantidade e não na qualidade do alimento larval. As operárias que recebem alimento adicional das células de outras operárias tornam-se rainhas em potencial, reconhecidas por várias características entre elas, a falta de corbícula, sendo que esta determinação ocorre ao final do estágio larval.

As rainhas são responsáveis pela postura de ovos férteis que darão origem a todas as outras castas. Após o acasalamento, a rainha apresenta abdômen bastante desenvolvido e por isso, são chamadas de fisogástricas (NOGUEIRA-NETO, 1997). As operárias são responsáveis pela manutenção do ninho. Nas abelhas melíferas, as atividades desempenhadas pelas operárias modificam-se de acordo com a idade e também com as necessidades da colônia, sendo a plasticidade, a principal característica na divisão de trabalho (ROBINSON, 1992). Esta plasticidade está ligada ao fato de as abelhas não apresentarem um padrão de divisão de trabalho rígido, já que podem desempenhar outras funções, dependendo das necessidades da colônia naquele momento.

Em *Nannotrigona* (*Scaptotrigona*) *postica*, os trabalhos executados pelas operárias foram subdivididos em seis grupos de atividades: a) trabalho com cera

(construção de lamelas, invólucros, potes de pólen e mel, vedação de frestas e raspagem de cera das células de cria); b) trabalho com a cria (construção, aprovisionamento e operculação das células, inserção nas células durante o aprovisionamento, postura e corte à rainha); c) lixeiras; d) receptoras de néctar (trabalhos com resina e desidratação); e) guarda e f) campeira. Desde o nascimento até 35º dia, a operária está envolvida em trabalhos com cera. As tarefas com a cria são realizadas entre o 16º e o 20º dia de vida, sendo que estas abelhas nunca abandonam a colônia, nem sequer se aproximam da passagem para o exterior. A desidratação e a recepção do néctar, bem como as atividades com resina começam no 21º dia, atingindo seu pico no 36º e terminando no 45º dia. Finalmente, os trabalhos de campo iniciam no 26º, com pico no 41º dia. A taxa de longevidade das operárias é de $39,5 \pm 9,8$ dias; além disso, foi também observada, uma plasticidade comportamental em três colônias normais desta espécie (SIMÕES & BEGO, 1979). A postura de óvulos pelas operárias é um fenômeno amplamente difundido entre meloponíneos. Em *S. aff. depilis*, as operárias podem fazer postura de dois tipos de óvulos, um arredondado na margem interna superior da célula, que são freqüentemente ingeridos pela rainha, comportamento considerado extremamente especializado (BEGO, 1977); e a outra forma de óvulo (alongada) é depositada após a postura da rainha, e a célula pode ser operculada com dois ou mais óvulos, podendo originar os machos. Neste caso vinga apenas o óvulo funcional (haplóide), já que se desenvolve primeiro e acaba alimentando-se dos demais. Ao contrário de muitas espécies, as operárias de *Scaptotrigona postica* são responsáveis por 95% da produção de machos (BEIG, 1972).

Os machos são indivíduos haplóides, uma pequena minoria é diplóide, estéril ou semi-estéril, não existindo diferenças morfológicas entre um e outro. Podem ser produzidos pela rainha ou partenogeneticamente pelas operárias. São responsáveis pela reprodução, acasalando-se com a rainha. Ao contrário de *Apis*, os machos retiram seu alimento das flores, podem executar trabalhos com cerume e desidratam néctar, além de produzirem cera (IMPERATRIZ-FONSECA, 1976; NOGUEIRA-NETO, 1997).

A formação de agregados de machos nas vizinhanças da colônia (Figura 2) é característico de Meliponinae, sendo descrito para várias espécies. Os agregados reúnem centenas de indivíduos voando ou em repouso (NOGUEIRA-FERREIRA, 1998). De acordo com ROUBIK (1990), os machos mantêm uma relação mútua, recrutando outros machos através de liberação de feromônios.



FIGURA 2 Agregados de machos de *Scaptotrigona* aff. *depilis* em frente à colônia.

1.1.3 Forrageamento e Comunicação

A fonte alimentar das abelhas é o néctar (fonte de energia) e o pólen (fonte protéica). As abelhas convertem o néctar para estocarem na forma de mel, através de um processo de inversão do açúcar e parcial desidratação. O número de flores que as abelhas visitam para coletar néctar ou pólen varia de acordo com o tipo de flor, hora do dia, umidade, e outros fatores que influenciam na concentração e no volume de néctar. A duração das viagens em qualquer espécie de abelha varia de poucos minutos a horas (MICHENER, 1974).

A mesma espécie, tanto em apíneos como em meliponíneos pode coletar pólen de uma ampla variedade de flores, porém, mostram preferência por determinados tipos (BEGO, 1989; MANNING, 1957). A gama de flores visitadas varia de uma espécie a outra e o fator de atração da flor também, podendo ser forma ou odor, por exemplo (MANNING, 1957). De acordo com as características da planta, a abelha pode mudar seu comportamento de forrageamento, tal como acontece com *Bombus* (MANNING, 1956).

Além das flores, outros fatores ambientais podem influenciar o forrageamento. Segundo RIBBANDS (1953 citado em MICHENER, 1974) os possíveis fatores relacionados a este comportamento são: temperatura, intensidade luminosa, vento, chuva, umidade relativa hora, tamanho da colônia, facilidade na obtenção de alimento, tipo de alimento, concentração de açúcar no néctar e abundância de néctar. O reconhecimento das áreas é garantido pela memória temporal e orientação compensada pelo tempo (ver o item Aspectos Cronobiológicos), que promove o retorno das abelhas à fonte alimentar na mesma hora do dia.

Nas espécies de *Scaptotrigona*, após poucos vôos, a forrageadora marca a vizinhança e pára a curtas distâncias do ninho, deixando uma série de marcas de cheiro no chão ou na vegetação (KERR & ESCH, 1965), provenientes da secreção da glândula mandibular, usadas para marcar as trilhas. Tais trilhas são formadas somente se a fonte de alimento estiver a uma certa distância do ninho e são polarizadas pois, as concentrações de secreção são maiores nas proximidades do alimento (KERR *et. al.*, 1963).

LINDAUER & KERR (1960) observaram que uma operária de *T. postica*, após 12 viagens até uma fonte de solução açucarada a 50m da colônia, marcou a rota e depois de alcançar um ponto a poucos metros da colônia, foi seguida por outras abelhas.

CRUZ LANDIM & FERREIRA (1968) postularam que em *T. postica*, as abelhas que ficam na entrada do ninho usualmente são recrutadas pela forrageadora marcadora de trilha, e que estas abelhas da entrada do ninho, seriam forrageadoras velhas que perderam a capacidade de marcar rotas. Há evidências de que além das marcas de cheiro, é necessária uma abelha guia para levar as novas forrageadoras até fonte alimentar (MICHENER, 1974).

Os feromônios de cheiro que, na verdade, são feromônios de alarme em baixas concentrações, quando liberados longe do ninho, produzem uma resposta inteiramente diferente daquela de alerta, produzida por uma alta concentração dentro do ninho. Na composição desta substância em duas espécies de *Scaptotrigona* existem dois componentes (2-heptanona e 2-nonanona) que em altas concentrações, estimulam a reação de ataque.

1.2 Aspectos Cronobiológicos

Na organização do sistema solar, a Terra é submetida a várias interações envolvendo forças de atração entre diferentes corpos celestes, ocasionando fenômenos repetitivos como dia/noite, estações do ano, fases da lua e oscilações das marés. Neste contexto, a antecipação de uma mudança ambiental que ocorreria inevitavelmente, prescindindo de sinais externos para iniciar o processo de ajuste interno às condições ambientais que mudariam em seguida, seria fundamental para a sobrevivência do organismo (MENNA-BARRETO, 1997).

A idéia do tempo como fator determinante na adaptação das espécies, implica num sistema de organização temporal mediado por um relógio biológico. Este é o gerador endógeno da expressão rítmica que se expressa, mesmo em condições ambientais constantes (ASCHOFF, 1960).

Ritmos são evidentes na maioria dos seres vivos: plantas mostrando épocas de floração alternadas com fases vegetativas, ciclos de atividade e repouso nos animais,

batimentos cardíacos e muitos outros. Quando se observa os diversos ambientes da Terra, pode-se igualmente detectar suas características cíclicas, muito bem definidas, tanto no meio biótico, como no abiótico. Assim, se o ambiente oscila, uma espécie para se adaptar a ele precisa oscilar também e a adaptação temporal consiste na harmonização entre a ritmicidade biológica e os ciclos ambientais. Esta harmonização promove a sincronização (denominada ‘arrastamento’ por PITTENDRIGH, 1960), de processos fisiológicos e comportamentais com os ciclos ambientais, bióticos e abióticos, na fase mais apropriada para a sua expressão. É através da vinculação das fases do ritmo atividade/repouso às fases do ciclo ambiental de claro/escuro, por exemplo, que se reconhecem espécies diurnas, noturnas e crepusculares.

A geração endógena da expressão rítmica caracteriza-se por ser um processo que varia periodicamente no tempo, ou seja, a manifestação de um fenômeno que se repete com o mesmo período, sendo este, o intervalo de tempo em que um ciclo se completa. Os valores de uma variável rítmica aumentam e diminuem numa escala definida, cujos valores determinam a amplitude da oscilação (Figura 3). Cada um dos instantes de um ritmo define uma fase, que é designada pela letra grega φ (fi). Os valores de uma variável passam pelo mesmo nível duas vezes no mesmo ciclo: uma vez aumentando e outra, diminuindo. Além da fase significar cada um dos momentos de um ritmo, em Cronobiologia, é comum utilizar-se deste termo para exprimir os estados de um processo ou de um ciclo ambiental. Pode-se falar em “fase de repouso” e “de atividade”, “fase de claro” ou fotofase e “de escuro” ou escotofase (MARQUES *et al.*, 1997).

Apesar de sua relação com os ciclos ambientais, os ritmos biológicos independem deles para a sua geração. A ritmicidade endógena expressa-se mesmo em condições ambientais constantes (ASCHOFF, 1960). Esta oscilação auto-sustentada endógena possui um período aproximado de 24 horas, razão pela qual é conhecido como ‘circadiano’ (HALBERG, 1959 citado em AFECHÉ, 1988).

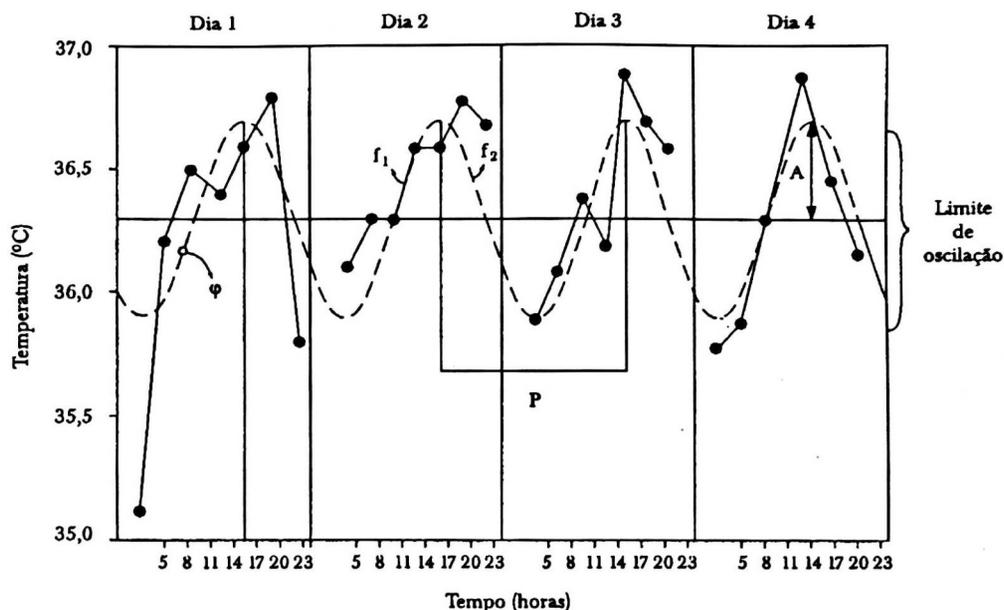


FIGURA 3. Representação de um evento rítmico hipotético com a curva ajustada mostrando os diferentes parâmetros (adaptado de AFECHE, 1988).

O ritmo em livre curso (Figura 4) é a expressão do relógio quando o organismo encontra-se em condições ambientais constantes. O período do ritmo em livre curso designado pela letra grega τ (tau) depende da espécie, do indivíduo e do seu estado fisiológico, das condições ambientais e da história ambiental (condições ambientais a que o indivíduo tenha sido previamente exposto). O ritmo endógeno tem seu período e fase ajustados aos ciclos ambientais através do processo de arrastamento (ASCHOFF, 1981). Este ocorre pelo estabelecimento de uma relação de fase entre o relógio endógeno e o sincronizador (ciclos ambientais como o claro/escuro, quente/frio, úmido/seco, além dos ciclos sociais) (Figura 3). O sincronizador é chamado de 'Zeitgeber', que significa doador de tempo, neologismo alemão criado por ASCHOFF (1960). O mecanismo através do qual o relógio biológico é sincronizado pelo ciclo ambiental baseia-se na propriedade da fase do ritmo em livre curso poder ser deslocada por breves pulsos de luz ou de temperatura (PITTENDRIGH, 1981).

O processo de arrastamento depende do deslocamento de fases, no entanto, até o arrastamento completar-se ocorrem "transientes" (PITTENDRIGH *et al.*, 1958) (Figura 4). Entende-se por transientes, ciclo ou conjunto de ciclos com período instável devido a um deslocamento de fase (MARQUES *et al.*, 1997). Por outro lado, a transferência de um organismo da condição de arrastamento para a de livre curso pode não trazer a

imediate expressão do ritmo endógeno. Isto porque o oscilador tende a preservar seu estado atual, devido a características inerciais. Este estado é conhecido como “pós-efeito” (PITTENDRIGH, 1960; PITTENDRIGH & DAAN, 1976).

1.2.1 Ritmos em Insetos

Os insetos têm servido de modelo para a pesquisa em Cronobiologia desde longa data. Entre os himenópteros, *Apis mellifera* é sem dúvida, a espécie mais estudada. MOORE & RANKIN (1985) demonstraram o caráter endógeno do ritmo locomotor de *A. m. ligustica*. Como acontece na maior parte dos outros grupos vegetais e animais, os ritmos biológicos das abelhas podem ser sincronizados por mais de um “zeitgeber”, inclusive, pelo ciclo de temperatura (MOORE & RANKIN, 1993). Mesmo quando o ciclo de temperatura não tem amplitude suficiente para sincronizar o ritmo de atividade de *A. mellifera*, ainda assim verifica-se uma modificação do padrão de arrastamento do ritmo sincronizado pelo claro/escuro, evidenciando o ciclo de temperatura como um ‘zeitgeber’ secundário ou como modulador do ritmo (MOORE & RANKIN, 1993). Estes dados vem de encontro às observações de CECCATO (1970) em que as operárias de *Melipona rufiventris flavolineata* são mais ativas na estação quente em relação à quase todas as tarefas realizadas. Além disso, a longevidade dessas abelhas é maior durante o verão quando comparada à estação fria Estes resultados sugerem que ambos os ciclos atuem sinergicamente sobre o sistema circadiano. Além destes, sabe-se que a disponibilidade de alimento também pode agir como 'zeitgeber' (SAUNDERS, 1982).

As abelhas melíferas visitam a fonte de alimento na mesma hora, todos os dias. No começo do século, FOREL (1910 citado em SAUNDERS, 1982) propôs que as abelhas teriam uma memória temporal, por ele denominada 'zeitgedächtnis'. Em 1929, BELING (citado em SAUNDERS, 1982) fez um treinamento com as abelhas, para que estas se alimentassem numa fonte artificial. No período de teste, a fonte alimentar foi retirada e, mesmo assim, as abelhas visitantes foram observadas no local do alimento. Nesta mesma época, WAHL (1932 citado em SAUNDERS, 1982) conduziu um experimento no interior de uma mina de sal a 180 metros abaixo da superfície terrestre afim de eliminar pistas da radiação cósmica. Durante os testes, as abelhas retornaram pontualmente à fonte alimentar, indicando a expressão de um mecanismo rítmico endógeno. A partir destes, outros experimentos foram realizados e chegou-se à conclusão de que a memória temporal das abelhas é um ritmo circadiano endógeno, que possui propriedades comuns a todos os sistemas circadianos. Acrescentando ainda às propriedades de um ritmo circadiano, FRISCH & ASCHOFF (1987) demonstraram as

características endógenas da memória temporal e os parâmetros da sincronização do ritmo de atividade pela oferta de alimento.

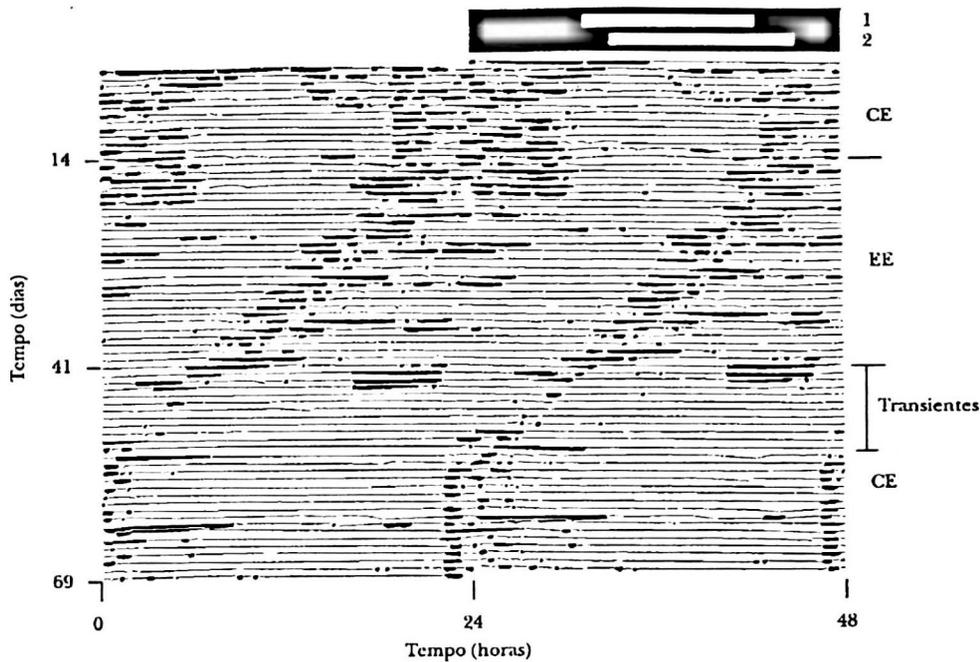


FIGURA 4. Actograma de uma barata *Leucophaea maderae* registrado em roda de atividade. Neste caso, os dados foram duplicados e dispostos de modo a permitir uma escala de 48 horas. O registro começa com o animal arrastado ao ciclo CE ilustrado pela barra superior (1). No décimo quarto dia, o ciclo CE é descontinuado e o animal entra em livre curso em EE, com período com cerca de 23,5 horas. No quadragésimo primeiro dia, o animal é exposto ao segundo ciclo CE (2). Após vários ciclos transientes, o ritmo é arrastado pelo ciclo CE (adaptado de PAGE, 1985)

Entre os fatores bióticos, a influência do componente social constitui-se em importante 'zeitgeber'. Esta demonstração foi feita, entre outras espécies, em *A. mellifera*. Dois grupos apresentaram ritmos metabólicos sincronizados por ciclos fotoperiódicos (claro/escuro - CE) diferentes, respectivamente (CE) 14:10h e (CE) 10:14h. A sincronização do ritmo metabólico dos dois grupos aconteceu em fases opostas. Quando foi permitido contato entre os dois grupos, houve inicialmente uma manutenção de freqüências e amplitudes de ambos. Após um deslocamento de fase de 6h, os picos passaram a ocorrer entre aqueles dos "grupos puros", indicando uma sincronização do ritmo metabólico pelo grupo. Os autores SOUTHWICK & MORITZ (1987) atribuíram

ao contato físico, assim como as interações relacionadas à trofaláxis entre as operárias, as propriedades sincronizadas ao ciclo social. De acordo com FRISCH & KOENIGER (1994), os períodos de atividade e repouso no interior da colônia resultam de uma sincronização mútua (social) do ritmo individual das abelhas. As castas desempenham uma função importante neste processo de sincronização. No experimento feito por MORITZ & SAKOFSKI (1991), a introdução de uma única operária não causou efeito no ritmo das demais operárias do grupo, enquanto que a introdução de uma rainha causou variação de fase no ritmo em livre curso das operárias.

1.2.2 Compensação da Temperatura

Uma das características da ritmicidade circadiana é ter seu período compensado pela temperatura (HASTINGS *et al.*, 1991), uma propriedade que diferencia dos demais processos biológicos e das reações bioquímicas, que são, em geral, acelerados com a elevação de temperatura e retardados com o abaixamento. Variações de 10°C, provocam aumento ou diminuição da velocidade desses processos, segundo um fator de 2 ou 3. O Q_{10} é a taxa de variação de um fenômeno, quando a temperatura varia de 10°C; o valor 1,0 representa ausência de variação. Esperava-se então, que os ritmos biológicos apresentassem reação semelhante. Porém, os ritmos endógenos mostram mudanças sutis, quando submetidos a mudanças de temperatura, desde que estas estejam na faixa permissiva para a espécie. Vários experimentos, de plantas a vertebrados, demonstram um Q_{10} de diversos ritmos próximos a 1,0, quando. Entre eles, o ritmo de bioluminescência da alga unicelular *Gonyaulax polyedra* (ritmo de bioluminescência), que apresenta um período (τ) de 25,3h à 22°C e posteriormente, um (τ) de 25,5h quando a temperatura aumenta para 32°C (HASTINGS & SWEENEY, 1957); o ritmo de deposição de lamelas da cutícula do gafanhoto *Schistocerca gregaria* apresenta um (τ) de 25,3h à 26°C, e à 36°C, o período é de 25,9h (NEVILLE, 1965 citado em MARQUES *et al.*, 1997).

A variação da temperatura altera a amplitude do processo que é sensível a ela, porém, o relógio pode continuar a oscilar sem sofrer influência da variação térmica. Nestes casos, quando a temperatura retorna ao nível inicial, o processo normaliza-se sem variação de fase ou período (BÜNNING, 1967).

O ciclo de temperatura é um 'zeitgeber' importante para os organismos de maneira geral. Pulsos de temperatura podem arrastar ou deslocar a fase do ritmo arrastado (MARQUES *et al.*, 1997). De qualquer maneira, os ciclos de temperatura são freqüentemente menos efetivos que os ciclos claro/escuro (BÜNNING, 1967). Segundo PAGE (1985), a barata quando submetida a um padrão ambiental em que a temperatura

ambiente é aumentada subitamente de 15° para 25°C sem passar por valores intermediários, o início da atividade mostra uma antecipação e ocorre 5h antes da fase fria do ciclo.

Apesar dos mecanismos bioquímicos relacionados à compensação de temperatura, ainda não estarem completamente compreendidos, o fato é que por causa desta propriedade os organismos mantêm-se sincronizados com seu meio ambiente, independentemente da variação circadiana e circanual da temperatura (MARQUES *et al.*, 1997).

1.2.3 Mascaramento

O arrastamento implica no envolvimento do oscilador biológico que tem sua fase ajustada por um ciclo ambiental. Fatores ambientais podem ter uma ação direta sobre o ritmo expresso, modificando-o, sem que haja envolvimento do relógio biológico, fenômeno que ASCHOFF (1960) chamou de 'mascaramento' (condições experimentais que poderiam ocultar as características e propriedades do relógio biológico), sendo freqüentemente considerado como grande empecilho para determinar o modo de ação e a expressão do sistema temporizador endógeno. Porém, a possibilidade do organismo responder a um sinal ambiental instantaneamente, mas não antes dele, proporciona uma flexibilidade que não lhe é permitida nos mecanismos rígidos do arrastamento e dá ao mascaramento um papel importante na adaptação temporal, como agente da plasticidade (MARQUES *et al.*, 1997).

De acordo com (RIETVELD *et al.*, 1993), tanto o arrastamento como o mascaramento podem alterar a expressão dos ritmos circadianos, da seguinte forma:

a) o ritmo circadiano pode ser mascarado por um sinal ambiental, ao qual o organismo seja sensível, independentemente do arrastamento ser produzido por este sinal.

b) o sinal do mascaramento que afeta diretamente o ritmo de atividade não trabalha via oscilador mas, pode alcançá-lo, simultaneamente.

c) o tempo de resposta ao mascaramento é o mesmo da duração do sinal (resposta tônica); o efeito do mascaramento não leva à antecipação, através do seu sinal.

A existência de relógios circadianos na maioria das espécies, permite a antecipação de mudanças do seu ambiente. A possibilidade de se estar preparado tanto

fisiologicamente como comportamentalmente para efetuar uma certa atividade, confere ao organismo a propriedade de estar continuamente ajustado a mudanças cíclicas do ambiente, além de temporalmente adaptado. Ao mesmo tempo, as respostas ao mascaramento são ferramentas importantes para ajustar o organismo ao ambiente, sendo consideradas uma via para alcançar a adaptação temporal (MARQUES & WATERHOUSE, 1994).

Um exemplo é o efeito da temperatura na atividade das forrageadoras. GIMENES *et al.* (1996) sugerem que o ciclo de temperatura, além de ser um 'zeitgeber' secundário, esteja sincronizando as visitas das abelhas *T. anthracina* (citada como *T. ventralis*) e *Rophitulus* sp (citada como *Heterosarellus* sp, MELO informação pessoal) às flores, age também como agente mascarador, já que as abelhas evitam a saída para o campo nas horas mais quentes do dia.

D'ALBORE (1988) estudando a atividade da forrageadora de *Bombus* spp num gradiente de altitude, observou que não existe supressão da atividade nas horas mais quentes do dia em altitudes mais elevadas, enquanto que nas baixas altitudes, os resultados apresentam um padrão bimodal desta atividade; sugerindo que a temperatura impõe um efeito mascarador na atividade destas abelhas, a partir de um determinado limiar.

II. OBJETIVOS

Dadas as características e as diferentes funções desempenhadas por cada casta, *S. aff. depilis* constitui-se em um sistema biológico bastante interessante para um estudo cronobiológico. Sendo uma espécie eussocial, é possível estudar muitos indivíduos com uma variação inter-individual muito pequena ou quase nula, o que é importante, uma vez que a observação do indivíduo é de central interesse para caracterizar um padrão rítmico determinado. Ainda, o fato das operárias que cuidam da cria nunca deixarem o ninho e, as forrageadoras realizarem muitas visitas diárias ao campo representa a possibilidade de estudo da interação de diversas frequências rítmicas. Além disso, a espécie aparentemente é um sistema interessante para o estudo de indivíduos de uma mesma colônia sincronizados por 'zeitgebers' diferentes. Assim sendo, este trabalho propõe o estudo de um dos componentes rítmicos de *S. aff. depilis*, qual seja o ritmo de atividade, estimado pelo número de saídas e entradas de forrageadoras da colônia. A caracterização do ritmo deve compreender a detecção de uma expressão em condições ambientais constantes e a identificação do(s) 'zeitgeber(s)' que o sincronizam.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Experimento I

Foram utilizadas duas colônias de *Scaptotrigona aff. depilis* Moure (1942) mantidas em caixas de madeira 30x27x15cm, com três orifícios de aproximadamente 1,0cm de diâmetro, sendo que dois deles eram utilizados para a instalação dos alimentadores e o outro comunicava-se com o meio externo. A caixa foi vedada com uma tampa de vidro (Figura 5).

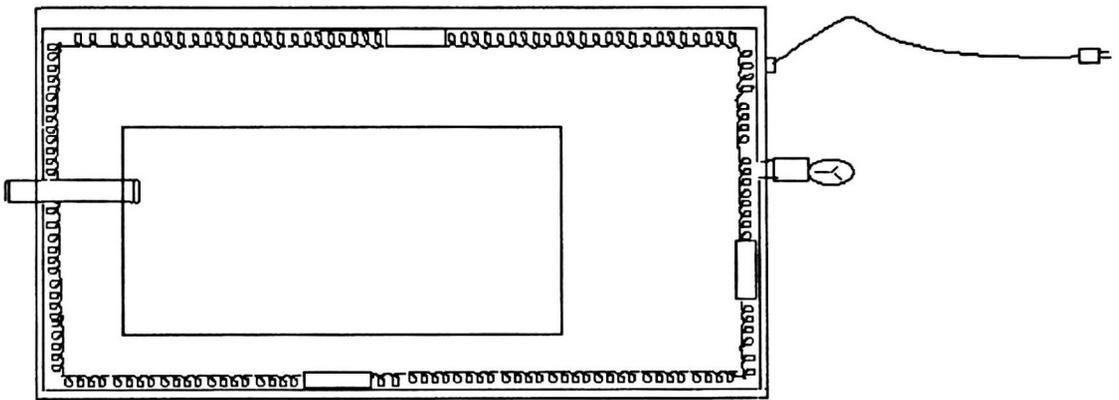


FIGURA 5. Esquema da colméia de observação (adaptada de SAKAGAMI, 1966).

O alimento foi oferecido *ad libitum*. Foram oferecidos dois tipos de alimento: a) xarope (solução de glicose cristalizada 60%) e b) pólen coletado por *Apis sp* desidratado, misturado com xarope. O pólen foi oferecido num tubo de polietileno vedado na extremidade oposta àquela de contato com a colônia, com fita adesiva. Este tubo era de aproximadamente 1,0cm de diâmetro e 10cm de comprimento.

O xarope foi oferecido num tubo de vidro com capacidade para 30ml, vedado com tampa de borracha.

As colônias foram mantidas no interior de estufas, no laboratório à temperatura constante de 28°C, umidade relativa 65%, em escuro constante. A iluminação do laboratório foi feita com lâmpada fluorescente revestida com filtro vermelho: Letravisiontm LV 207, PAF-1 Letrasettm esselte, mais três camadas de papel celofane vermelho. O filtro também foi aderido às tampas de vidro das colônias, alimentadores,

bem como, aos tubos de acesso das abelhas ao meio externo. Este acesso das abelhas ao meio externo foi feito através de um tubo de polietileno de aproximadamente 25cm que atravessava a parede do laboratório.

O uso deste filtro manteve o ambiente interno do laboratório e das colônias, sob luz vermelha (cerca de 680nm), condição de escuro para as abelhas, uma vez que elas não enxergam nesta faixa do espectro.

No meio externo, a colônia controle A foi submetida à condição de claro-escuro ambiental, enquanto que a colônia experimental B, à condição de claro constante.

A extremidade externa do tubo de acesso da colônia A foi vedada com organza para evitar a saída das abelhas, porém, sem impedir a percepção do claro-escuro ambiental.

A colônia B teve a extremidade externa de seu tubo vedada da mesma forma que a colônia A, porém o tubo foi conectado a uma gaiola de madeira de 110x70x80cm, revestida com tela de nylon (malha fina) e coberta com plástico lona preto, isolando completamente o meio interno da luz ambiental. No interior da gaiola foi colocada uma lâmpada incandescente de 100W, o que proporcionou uma intensidade luminosa de 2000lux, garantindo as condições de claro constante.

3.1.1 Coleta de Dados

A coleta de dados foi feita através de filmagens das abelhas no tubo de saída, a cada 3 horas durante 3 minutos. Para tanto, foi utilizada uma filmadora PANASONIC S-MS Movie, NV – M9000 PN.

Na gaiola da colônia B havia um orifício lateral que permitia o encaixe da lente da filmadora, sendo que após o registro, o orifício era devidamente vedado.

Para garantir maior nitidez nas imagens do tubo da colônia A, no momento das filmagens foi utilizada uma luminária com lâmpada fluorescente revestida com filtro vermelho.

O experimento teve início no dia 18/01/98 às 19:00 horas e terminou no dia 21/01/98 às 19:00 horas.

Posteriormente, as imagens foram analisadas e procedeu-se à estimativa aproximada do número de abelhas que se localizavam nos tubos, em cada um dos registros. Os dados obtidos foram registrados com os respectivos horários em que foram feitas as observações. Em alguns horários havia uma grande concentração de abelhas no tubo, mais especificamente da colônia controle A, o que dificultou a contagem. Neste caso, o número de abelhas registrado naquele momento, foi estimado com base no número de indivíduos que aquela área do tubo pudesse conter.

3.1.2 Desenvolvimento de um sistema de tomada de dados – Descrição e Comentários

Antes de iniciar o registro das saídas e entradas das abelhas (Experimento II), os tubos que conectavam as colônias com o meio ambiente sofreram várias modificações.

A primeira versão do tubo era em forma de Y e foi utilizada pela primeira vez em julho de 97. Os tubos foram conectados às colônias na região anterior à bifurcação. Uma das bifurcações era a via de entrada e a outra, a de saída para o meio ambiente.

Em cada bifurcação havia um sensor (célula fotoelétrica) para captar a passagem de cada abelha. Neste local havia um estrangulamento do tubo, de forma que permitisse a passagem de apenas uma abelha.

No local do estrangulamento, foi instalada uma portinhola de acetato fixa apenas na região superior. Dessa forma, as abelhas poderiam empurrá-la e atravessar o tubo normalmente. A portinhola abria no sentido do fluxo das abelhas.

Após dois dias, as abelhas de uma das colônias vedou a saída com cerume, inclusive, fixaram a portinhola de modo que ela permanecia aberta, o que favoreceu a entrada e a saída pela mesma via. Foi observado também, que a maior dificuldade das abelhas era encontrar a entrada para o interior da colônia.

Uma tentativa para solucionar o problema, foi reduzir o comprimento do tubo em cerca de 7,5cm. Na manhã seguinte, foi observado novamente o depósito de cerume e nenhuma movimentação no interior do tubo.

A outra modificação foi revestir uma parte do tubo (entrada) com plástico lona preto, sendo que desta forma, as abelhas reconheceriam o tubo como parte do ninho (MATEUS, informação. pessoal). Foi observada uma grande movimentação na entrada porém, ainda havia obstrução de uma das vias do tubo por cerume.

Procedeu-se então, uma nova modificação no tubo que resultou na diminuição do ângulo que separava as vias de entrada e saída, já que na natureza não existem duas vias de acesso ao ninho (BEGO, informação pessoal). Além disso, o que era entrada tornou-se saída e vice-versa.

Um outro obstáculo para as abelhas era a portinhola. Foi necessária uma perturbação no tubo para que as abelhas saíssem para o ambiente. Mesmo assim, havia muita dificuldade no fluxo de entrada e saída.

A seguir, o tubo foi colocado em uma outra colônia, que apresentava uma população maior e conseqüentemente, um fluxo maior de indivíduos que atravessavam o tubo. Foi observado que uma ligeira inclinação do tubo para baixo, permitia maior

movimentação da portinhola, facilitando o reconhecimento das abelhas para sair para o meio.

Outra medida importante, foi colocar um pedaço do cano de polietileno que estava acoplado anteriormente à colônia, ao tubo na via de entrada pois, este cano contém um funil de cerume construído pelas próprias abelhas, de forma que este procedimento contribuiu para o reconhecimento da via de entrada pelas operárias.

Posteriormente, os tubos foram retirados para os últimos reparos e limpeza do excesso de cerume depositado. No entanto, decidiu-se construir um novo tubo, onde entrada e saída apresentassem a mesma direção, ou seja, estas duas vias de acesso foram separadas no interior do tubo apenas por uma parede. Além disso, o tubo foi confeccionado em acrílico e foi acoplado um cano de polietileno, com um círculo de papel cartão-amarelo, com diâmetro de 11cm, com o objetivo de facilitar o reconhecimento da via de entrada, pelas abelhas. O tubo de acrílico foi instalado e durante dois dias, as abelhas saíam e entravam pelas vias corretas. Depois deste tempo, houve deposição de cerume, obstruindo uma das vias de acesso.

O tubo foi então, retirado e limpo. Posteriormente, foi revestido com plástico lona preto, permanecendo assim por cinco dias (Figura 6). Uma parte do plástico preto foi rebatida, na altura da portinhola, onde aconteceu a obstrução anterior e não havia nenhum depósito de cerume, obstruindo a via de acesso.

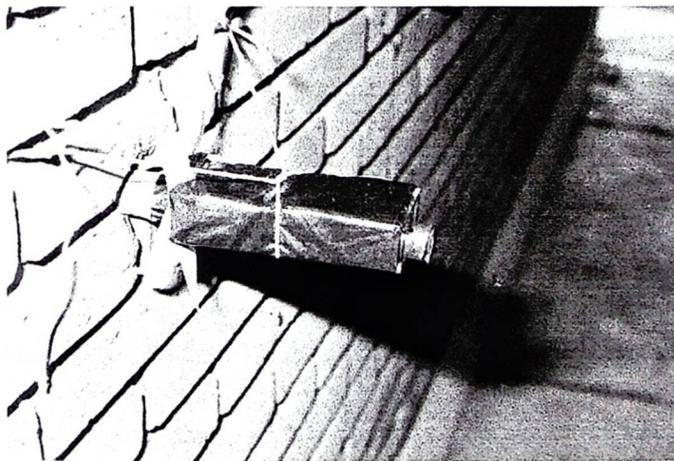


FIGURA 6. Tubo de acrílico da colônia controle revestido com plástico preto.

As abelhas começaram a construir um funil de cerume na saída. Após cerca de dez dias, as abelhas construíram o funil nas duas vias de acesso (entrada e saída), de forma que a portinhola da saída ficou presa e entreaberta, permitindo assim, a entrada e a saída pela mesma via (Figura 7). O plástico preto foi retirado do tubo e observou-se a mesma situação na portinhola da entrada, no interior do tubo.

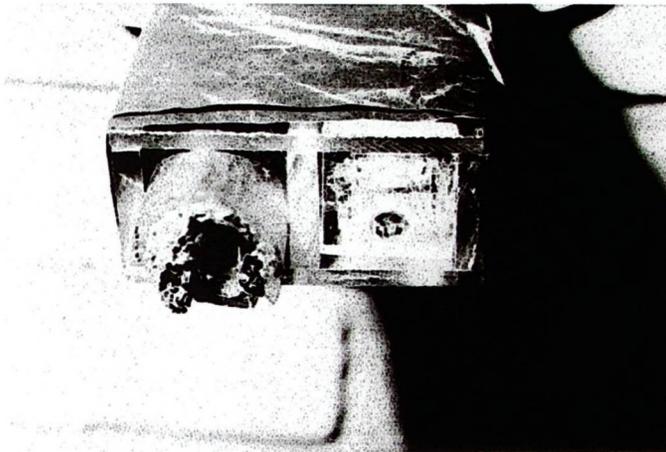


FIGURA 7. Vista da entrada do tubo de acrílico da colônia controle, detalhe do funil de cerume depositado no cano de polietileno.

Novamente o tubo foi retirado e limpo. Cerca de dois dias depois, a mesma situação foi observada, e o tubo foi limpo e recolocado. Três dias depois, foi observado um esboço de um funil, na saída. A construção deste funil é rápida, mais ou menos um dia.

Toda vez que a portinhola estava emperrada, a portinhola do interior do tubo, também estava obstruída.

Devido a estes problemas o tubo de acrílico foi ainda mais modificado. A via de entrada para o interior da colônia foi aumentada em comprimento e um pedaço de cano de polietileno foi acoplado, para facilitar o reconhecimento por parte das abelhas. Além disso, no tubo de entrada foi encaixada uma estrela de papel-cartão amarelo. De acordo com MANNING (1992), as abelhas tem preferência por objetos que possuam contornos em pontas pois, as imagens das bordas passam pelos omatídeos de seus olhos, gerando um efeito parecido com o de uma fonte de luz cintilante (Figura 8).

As abelhas continuaram vedando uma das passagens. O plástico preto foi retirado. Manteve-se a portinhola aberta. Nos primeiros cinco minutos de observação, constatou-se que as abelhas entravam e saíam pelas vias corretas.

Posteriormente, os tubos foram instalados definitivamente.

3.2 Experimento II

Foram utilizadas duas colônias de *Scaptotrigona aff. depilis* Moure (1942) mantidas em caixas de madeira e em estufas a 27°C, tal como no experimento I.

Essas colônias encontravam-se no mesmo laboratório e o interior deste foi submetido à condição de escuro constante, precisamente como na descrição do experimento I, inclusive o revestimento com o filtro vermelho.

A colônia B do experimento anterior também foi utilizada como colônia experimental, por apresentar ótimas condições em termos de número de indivíduos, tamanho dos favos e oviposição. No entanto, a colônia controle foi trocada por outra colônia que reunia melhores condições

O tubo de acesso ao meio externo da colônia controle foi acoplado ao tubo de acrílico com as células fotoelétricas permitindo assim, a saída das forrageadoras para o meio externo.

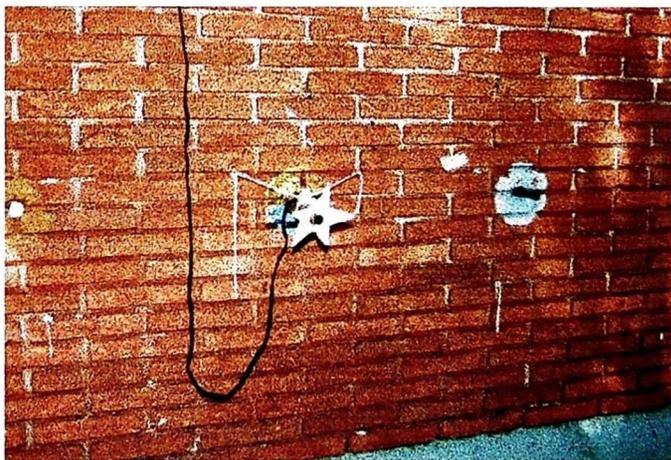


FIGURA 8. Estrela acoplada ao tubo de polietileno para facilitar o reconhecimento da entrada da colônia pelas abelhas.

O tubo de acesso da colônia experimental também foi acoplado a um tubo de acrílico que continha células fotoelétricas. A extremidade posterior deste tubo estava conectada a um balão de 59cm de comprimento por 110cm de diâmetro mantido por armação de fio metálico galvanizado, e completamente revestido por organza. Deste

modo, saindo da colônia, as abelhas tinham acesso ao tubo de acrílico e a seguir, ao balão (Figura 9)

O conjunto tubo de acrílico mais balão, localizava-se no interior da gaiola que foi utilizada no experimento I.

Para aumentar a intensidade luminosa no interior da gaiola, o teto e as paredes internas foram revestidos com papel alumínio. No vão de 60cm entre o chão e a base da gaiola foi instalada uma lâmpada incandescente de 100W, suportada por uma armação de madeira, afim de garantir a condição claro constante. Nesta armação e sobre a lâmpada foi colocada uma cuba com água, para garantir a umidade e reduzir os efeitos da temperatura.

A gaiola foi completamente revestida com plástico lona preto, para isolar o seu interior de qualquer pista ambiental externa.

Para garantir a temperatura constante de 27°C em média no interior da gaiola, foi necessário colocá-la dentro do laboratório com ar condicionado, a temperatura de 23°C. Além disso, foi acoplado à gaiola um circulador de ar e do lado oposto, um tubo de diâmetro 46cm e comprimento 336cm de plástico lona preto, para permitir a circulação e saída do ar.

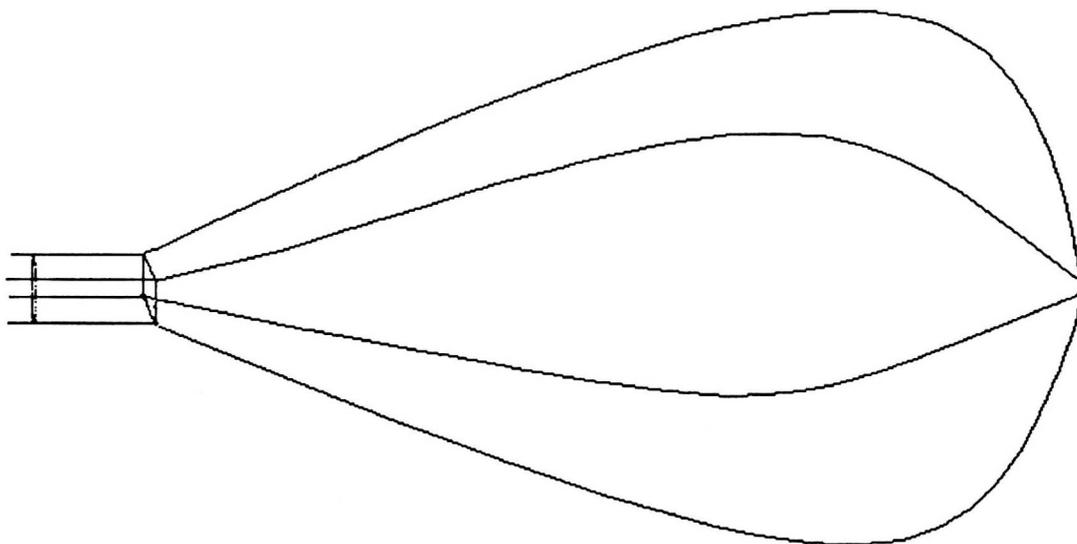


FIGURA 9 – Esquema do balão que foi acoplado ao tubo de saída da colônia experimental.

Depois de todas as condições experimentais asseguradas, as colônias permaneceram neste estado por quatro dias antes do início do registro dos dados, para eliminar os possíveis pós-efeitos.

Apesar do tubo de acrílico apresentar duas vias de acesso (entrada e saída), foi desprezada uma via, pois a deposição de cerume pelas abelhas continuou e não era possível fazer interferências contínuas para limpar o tubo. Dessa forma, o registro obtido representa a somatória de entradas e saídas das forrageadoras.

3.2.1 Equipamento para a Coleta de Dados - Descrição e comentários

O apidômetro AP97 é um quádruplo sensor óptico de infravermelho, cuja função é detectar a passagem de abelhas através de um conduto, que serve como entrada e saída da colméia (um duto para entrada e outro para saída, ligados em outro principal de acesso a colméia). O circuito é composto de 04 “Flipflops 7473”, que uma vez acionado através de um par de sensores de infravermelho, pela passagem da abelha, subirá para o nível lógico “1”, permanecendo nesse estado até que o computador envie um sinal de “Reset”, retornando então a “0” sua saída. O sinal enviado pela saída monoestável é colocado na saída da porta paralela de qualquer computador padrão (XT, AT). Os sinais enviados pela interface AP97 serão tratados através de ‘software’ especificamente desenvolvido para esta finalidade, ou seja, aquela de gerenciar a coleta de dados na interface paralela do micro.

Este equipamento permite registrar e quantificar toda a atividade desenvolvida pelas forrageadoras no tubo de saída da colméia. Além disso, é possível determinar a direção (para dentro ou para fora da colônia) do movimento, dado que os condutos de saída e entrada são monitorados separadamente.

O computador 386, onde o software registrava dados a cada 15 minutos, era desativado e reinstalado a cada 24 horas.

Os dados foram coletados das 16:00 horas do dia 22 de abril de 1998 até o dia 6 de maio de 1998, perfazendo um total de 336 horas de registro contínuo.

3.3 Análise Estatística – Cosinor

De acordo com HALBERG *et al.* (1977 citado em BENEDITO-SILVA, 1997), a Cronobiologia preocupa-se em quantificar e investigar os mecanismos de estruturas temporais biológicas. Neste contexto, uma série de condições fisiológicas e comportamentais vão mudando com o tempo. Essa recorrência periódica não pode ser analisada através de metodologias que pressupõem a constância; daí a necessidade da utilização de uma metodologia apropriada para que esta repetição periódica possa ser

explicitada. Assim, o método deve levar em conta a análise de séries temporais, ou seja, uma seqüência qualquer de dados em função do tempo (valores dependentes do tempo).

O método Cosinor foi proposto por HALBERG e colaboradores (1972) consiste em ajustar uma série temporal de N dados medidos, y_i , $i= 1, 2, \dots, N$ à uma função cosseno, de tal forma que y_i possa ser expresso por:

$$y_i = M + A \cos [(360/T)ti + \varphi] + e_i$$

y_i é o valor do i -ésimo ponto da série de dados de N pontos;

ti é o instante em que a variável y_i foi medida;

M é o Mesor, estimado pelo Cosinor, que corresponde ao valor médio da função cosseno; Mesor significa *Midline Estimating Statistics of Rhythm*;

A é a amplitude, estimada pelo Cosinor, da função cosseno;

T é o período, conhecido *a priori*, da função cosseno que se ajusta à série temporal;

φ é a acrofase, estimada pelo Cosinor, que corresponde ao ângulo de fase do valor máximo da função cosseno, expressa em graus angulares;

e_i é o erro residual, no instante ti , que corresponde à diferença entre o valor y_i medido e o valor da função cosseno ajustada à série temporal no instante i . Estes devem ter uma distribuição normal, independente e aleatória, com média zero e com variância igual para todas as medidas da série temporal.

A equação pode ser representada também por:

$$y_i = M + \beta \cos \omega ti + \gamma \sin \omega ti + e_i$$

onde: $\beta = A \cos(\varphi)$; $\gamma = -A \sin(\varphi)$; $\omega = 360/T$ de forma a transformá-la numa equação linear com os parâmetros M , β , γ .

Uma vez ajustada a curva cosseno à série temporal, o cosinor testa a validade desse ajuste com as ferramentas estatísticas, verificando se a flutuação da variável em questão é cíclica. Este ajuste é dado pelo método dos mínimos quadrados. Este teste verifica se a curva ajustada com período de 24 horas é uma boa aproximação para os dados com um nível de significância de 5%. Se o teste mostra que $A = \emptyset$ (nulo) é um valor possível para a amplitude, então esse ajuste deve ser rejeitado, pois uma oscilação com amplitude nula, nada mais é que uma reta com coeficiente angular nulo (BENEDITO-SILVA, 1988).

A significância estatística da curva ajustada pode ser testada contra a hipótese nula de que a amplitude A é zero. Este teste consiste em calcular o nível descritivo (p -value), a partir da taxa de variabilidade (VR), e compará-lo com o nível de significância estabelecido no teste. A porcentagem rítmica (PR ou %) avalia quanto da série temporal pode ser explicada por uma curva cosseno (BENEDITO-SILVA, 1997).

Mesmo assim, o método ainda possui alguns pontos discutíveis, como por exemplo a definição de um ritmo populacional estatisticamente significativo. A sua aplicação torna-se mais efetiva na análise de séries individuais (NELSON *et al.*, 1979).

Devido a este fator, a análise estatística do experimento foi quebrada em blocos de 4, 5 e 7 dias. Quanto às desvantagens, nem toda série temporal tem a forma de cosseno, além disso o método exige que os erros residuais sejam independentes, tenha distribuição normal com média zero e variância igual em todos os pontos, os dados devem ter uma distribuição homogênea dentro do período que se está investigando (BENEDITO-SILVA, 1997).

IV. RESULTADOS

4.1 COMPORTAMENTOS OBSERVADOS

4.1.1 Experimento I

No experimento I, a colônia controle foi submetida à condição de claro/escuro ambiental e apresentou movimentação intensa no tubo de saída durante a fotofase. Esta movimentação foi caracterizada por caminhadas rápidas em direção à extremidade do tubo que estava vedada e volta para o interior do ninho. Porém, havia abelhas que permaneciam paradas ao longo do tubo. Durante a noite havia pouca ou nenhuma movimentação, já que a grande maioria das abelhas que permaneciam no tubo ficavam paradas.

Durante o dia, mesmo com o tubo completamente tomado pelas operárias, havia abelhas que tentavam caminhar, empurrando as outras até abrir espaço. Também foi observado nesta colônia, transporte de material do interior do ninho para o tubo. A maioria das operárias que saíam carregavam bolinhas do material nas mandíbulas. Provavelmente este material seja lixo, pois as operárias voltavam com ele para o interior da colônia, já que o acesso ao meio estava obstruído pela organza na extremidade do tubo.

Houve deposição de cerume na parede interna, no terço distal do tubo, sendo que a organza foi completamente revestida. Inclusive, foi possível observar que as operárias trabalhavam com as mandíbulas o cerume depositado.

A colônia experimental mantida sob condição de claro constante, apresentou atividade durante o decorrer das 24h (Figura 10). As abelhas caminhavam rapidamente do ninho para a extremidade do tubo, sendo que algumas concentravam-se no terço distal deste, outras voltavam rapidamente, porém, não foi observado em nenhum momento operárias paradas, também houve episódios de vôo.

Com relação ao transporte de material, observou-se apenas depósito de cerume na organza que vedava o tubo, que ficou parcialmente coberta. No tubo não foi observado nenhum depósito.

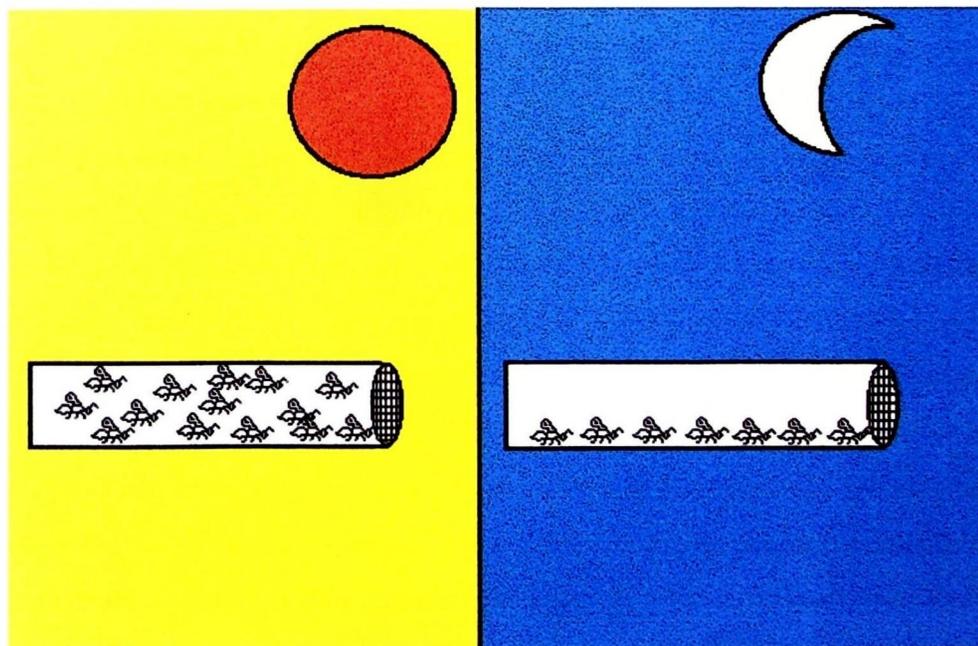


FIGURA 10. Esquema da movimentação no tubo de saída da colônia controle (painel da direita) e experimental (painel da esquerda) durante a noite.

4.1.2 Experimento II

A colônia controle submetida ao claro/escuro ambiental com livre acesso ao meio ambiente apresentou atividade durante a fotofase, ou seja, as forrageadoras saíam e entravam da colônia durante o dia, sendo que a última saída era determinada pela intensidade luminosa, já que muitas vezes, a temperatura encontrava-se dentro da faixa permissiva para tal atividade. Durante a noite, as abelhas permaneciam no tubo, mas não saíam para o meio ambiente. Estas operárias trabalhavam com cerume, abrindo e fechando as mandíbulas e depositando este material ao longo do terço proximal do tubo.

A colônia experimental apresentou atividade ao longo das 24 horas. As abelhas saíam e entravam para o interior do balão acoplado ao tubo de saída, sendo que a intensidade de movimentação não foi uniforme durante o período de 24 horas. Observou-se que algumas operárias além de caminharem pelo tubo, faziam vôos curtos, mas a maioria das abelhas concentravam-se próximas à fonte luminosa.

As operárias exploraram praticamente o balão inteiro pois, foi possível observar pequenos depósitos de cerume em quase todo o compartimento. Inclusive, a intensa deposição de cerume ao redor da portinhola do tubo, contendo as células fotoelétricas (Figura 11), impossibilitou o movimento de abrir e fechar, de tal forma que as abelhas preferencialmente escolheram a via de entrada do tubo como acesso à colônia e ao meio externo. Próximo ao tubo que continha a célula fotoelétrica foram construídas lamelas transversais de cerume. Havia na superfície da parede inferior do balão restos de abelhas mortas (lixo).

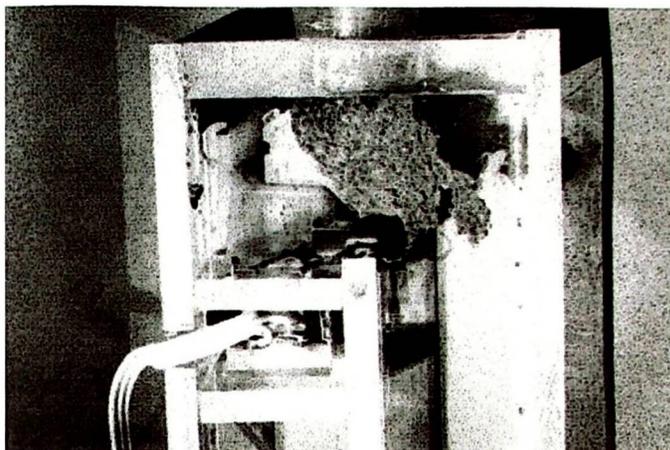


FIGURA 11. Depósito de cerume (B) obstruindo uma das vias de acesso e impedindo o movimento da portinhola (A).

4.2 Ritmo de Atividade

4.2.1 Experimento I

Este experimento permitiu detectar um ritmo circadiano, confirmado pelo procedimento estatístico utilizado, o Cosinor (descrito no item 2 em Material e Métodos). A análise dos dados da colônia experimental mostrou que o período de 23 horas apresentou maior porcentagem rítmica (%R = 76,17), indicando o quanto da série temporal analisada pode ser explicada por uma curva cosseno, nível de significância $p < 0,001$ e Mesor, 35,19 , ou seja, o número médio de indivíduos concentrados no tubo (Tabela I e Figura 12).

TABELA I - Resultados obtidos a partir do tratamento estatístico do método Cosinor.
 Dados da colônia experimental sob a condição de claro constante
 (duração: 3 dias).

COLÔNIA EXPERIMENTAL	
Período: 23h	
Mesor	35.19
Amplitude	22.02
% R	76.17
p-value	< 0,001

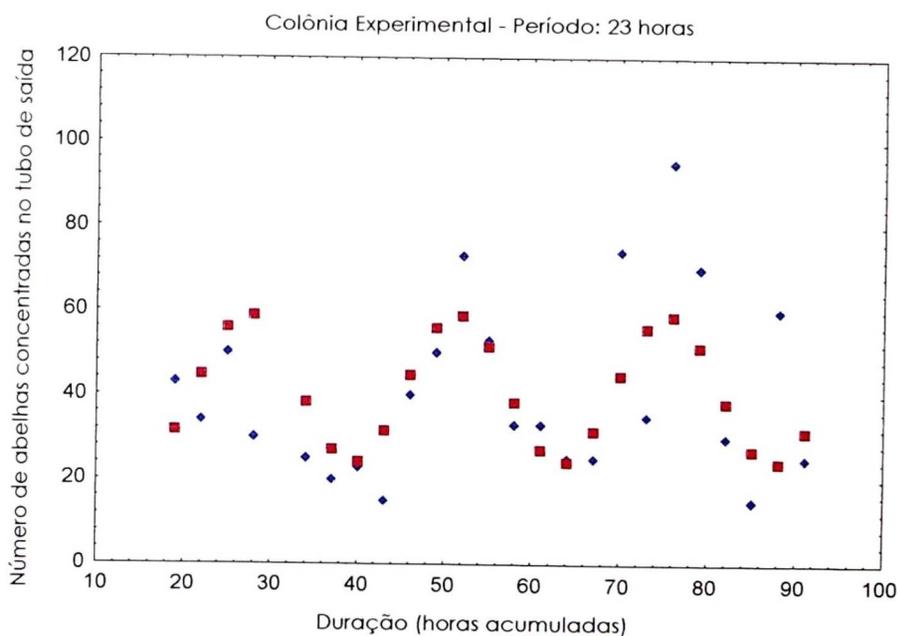


FIGURA 12 - Número de abelhas em atividade no tubo de saída da colônia, sob claro constante. Os pontos azuis representam os dados obtidos e os quadrados vermelhos são ajustados baseados nos dados tratados pelo método Cosinor (vide texto).

Na análise dos dados da colônia controle obteve-se maior porcentagem rítmica (%R = 36,32) no período de 23 horas, nível de significância $p < 0,01$, com acrofase às

6:17 horas correspondendo à hora do relógio e Mesor, 45,47 que neste caso foi maior em relação à colônia experimental (Tabela II e Figura 13).

TABELA II - Resultados obtidos a partir do tratamento estatístico do método Cosinor. Dados da colônia controle submetida ao claro/escuro ambiental (duração: 3 dias).

COLÔNIA CONTROLE	
Período: 24h	
Mesor	41.49
Amplitude	17.51
Acrofase	3:18h
% R	36.25
p-value	< 0,01

As figuras 12 e 13 apresentam as curvas esperadas cosseno ajustada aos dados observados. Na abscissa está plotado o tempo do experimento em horas acumuladas e na ordenada está o número de indivíduos em atividade.

No início de experimento às 19 horas, na colônia experimental observou-se um número pequeno de abelhas (aproximadamente 7 indivíduos) e com pouca movimentação (caminhavam lentamente). Enquanto que na colônia controle havia um número bem maior (43 indivíduos), praticamente sem movimentação, as abelhas permaneciam paradas no tubo.

Às 4 horas, o número de indivíduos na colônia experimental havia dobrado, com movimentação intensa (caminhavam rapidamente, havendo também episódios de vôo). Apenas no primeiro dia às 7 horas, a colônia controle apresentou um pico de concentração de indivíduos (aproximadamente 130 abelhas).

O comportamento de trazer material do interior do ninho para o tubo nas mandíbulas em intervalos regulares, pela maioria das operárias da colônia controle, ocorreu nos seguintes intervalos: das 10 às 16 horas, nos dois primeiros dias e das 4 às 16 horas, no último dia do experimento.

O ritmo de atividade da colônia experimental deve ter sofrido influências da variação da temperatura que ocorreu no interior da gaiola, já que estava exposta aos raios solares do dia (Tabela III). Neste período, o calor foi intenso ao meio do dia.

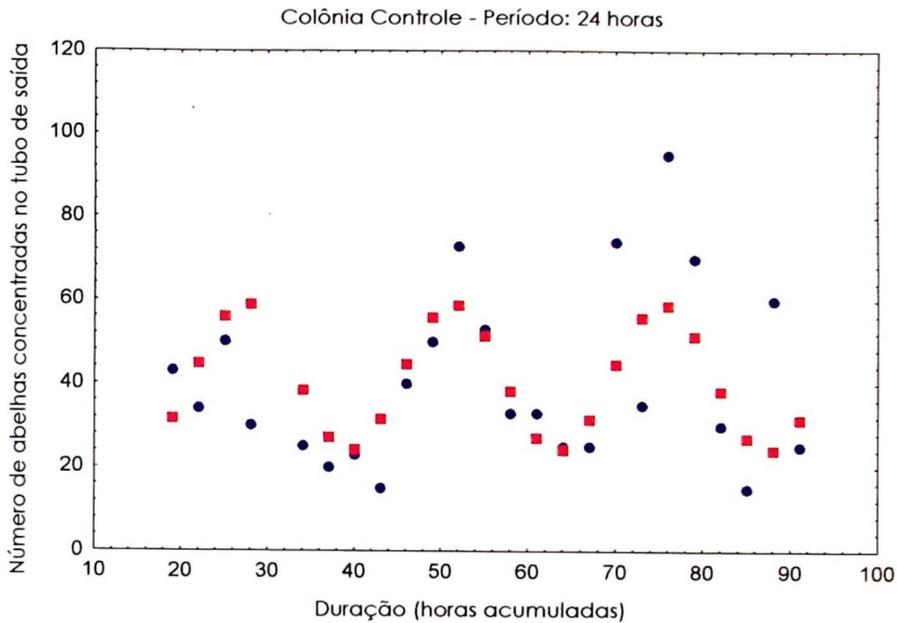


FIGURA 13 – Número de abelhas em atividade no tubo de saída da colônia, sob claro/escuro ambiental. Os círculos azuis representam os dados obtidos e os quadrados vermelhos são ajustados baseados nos dados tratados pelo método Cosinor.

4.2.2 Experimento II

Neste caso, o tempo de duração do experimento (14 dias) foi um fator significativo, fornecendo um alto número de dados contínuos para o entendimento do comportamento do relógio biológico.

Neste experimento, a análise dos dados foi feita através do procedimento Cosinor. Os 14 dias de coleta de dados foram analisados associando os dados em intervalos de 4, 5 e 7 dias (Tabelas IV, V e VI).

TABELA III – Tabela de variação de temperatura ocorrida no período do experimento I no interior da gaiola coberta por plástico lona preto e que estava acoplada ao tubo de saída da colônia experimental.

Dia	Hora	Ambiente	Gaiola
		Temperatura	
17/02/98	11:00	24,5°	29,0°
17/02/98	14:00	28,0°	36,5°
17/02/98	17:00	27,5°	34,0°
17/02/98	20:00	26,0°	33,0°
17/02/98	23:00	25,0°	34,0°
18/02/98	2:00	23,5°	32,5°
18/02/98	5:00	22,0°	32,0°
18/02/98	8:00	22,0°	33,0°
18/02/98	11:00	26,0°	37,0°
19/02/98	11:00	24,0°	29,0°
19/02/98	14:00	29,0°	37,5
19/02/98	17:00	29,0°	37,0°
19/02/98	20:00	30,0°	34,0°
19/02/98	23:00	26,0°	35,0°
20/02/98	2:00	25,0°	34,0°
20/02/98	5:00	24,5°	33,0°
20/02/98	8:00	22,5°	33,0°
20/02/98	11:00	26,0°	29,0°

TABELA IV - Resultados obtidos a partir de tratamento estatístico pelo Método Cosinor. Dados da colônia experimental sob claro constante (14 dias). **A-** Análise do primeiro bloco (4 primeiros dias). **B-** Análise do segundo bloco de 4 dias. **C-** Análise do terceiro bloco de 4 dias.

COLÔNIA EXPERIMENTAL							
A		B		C		D	
Período: 24:36h		Período: 22:36 h		Período: 21:36 h		Período: 21:00	
Mesor	351.96	Mesor	440.46	Mesor	587.86	Mesor	700,01
Amplitude	63.31	Amplitude	51.61	Amplitude	93.69	Amplitude	16,03
% R	21.07	% R	8.98	% R	31.09	%R	3,77
p-value	< 0,001	p-value	< 0,01	p-value	< 0,001	p-value	< 0,5

TABELA V - Resultados obtidos a partir do tratamento estatístico do Método Cosinor. Dados da colônia experimental sob claro constante (14 dias). **A-** Análise do primeiro bloco (5 primeiros dias). **B-** Análise do segundo bloco (5 dias). **C-** Análise do terceiro bloco (5 dias).

COLÔNIA EXPERIMENTAL					
A		B		C	
Período: 24h		Período: 23:23h		Período: 21h	
Mesor	364.87	Mesor	480.19	Mesor	672.28
Amplitude	58.20	Amplitude	50.49	Amplitude	54.71
% R	17.79	% R	7.88	% R	20.45
p-value	< 0,001	p-value	< 0,01	p-value	< 0,001

TABELA VI - Resultados obtidos a partir do tratamento estatístico do Método Cosinor. Dados da colônia experimental sob claro constante (14 dias). **A-** Análise do primeiro bloco (7 primeiros dias). **B-** Análise do segundo bloco de 7 dias.

COLÔNIA EXPERIMENTAL			
A		B	
Período: 24h		Período: 22h	
Mesor	402.80	Mesor	583.29
Amplitude	48.64	Amplitude	57.60
% R	9.51	% R	6.97
p-value	< 0,001	p-value	< 0,01

Todos os intervalos apresentaram os seguintes resultados, com $p < 0,05$:

- Os primeiros intervalos apresentaram um ritmo em livre curso com um período de aproximadamente 24 horas.
- Os intervalos intermediários mostraram um ritmo em livre curso, com um período aproximado de 23 horas.
- Os intervalos finais apresentaram um ritmo em livre curso, com período aproximado de 21 horas.

No oitavo dia de experimento, a gaiola permaneceu no escuro das 15:00 às 15:15h, pois a lâmpada queimou.

A colônia controle que estava submetida ao ciclo claro/escuro ambiental apresentou atividade durante a fotofase, enquanto que à noite as abelhas permaneciam no tubo, mas não saíam para o meio ambiente. Nesta colônia também foi observado, que durante a noite as operárias trabalhavam com cerume no tubo, depositando este material ao longo do terço proximal (Tabela VII, VIII e IX e Figuras 14, 15, 16, 17, 18 e 19).

TABELA VII - Resultados obtidos a partir do tratamento estatístico do Método Cosinor. Dados da colônia controle submetida ao claro/escuro ambiental (14 dias). **A-** Análise do primeiro bloco (4 primeiros dias). **B-** Análise do segundo bloco de 4 dias. **C-** Análise do terceiro bloco de 4 dias.

COLÔNIA CONTROLE							
A		B		C		D	
Período: 24h		Período: 24:12h		Período: 23:23h		Período: 23 h	
Mesor	309.47	Mesor	315.21	Mesor	216.23	Mesor	255,35
Amplitude	328.76	Amplitude	319.07	Amplitude	282.70	Amplitude	293,94
Acrofase	11:17	Acrofase	11:51h	Acrofase	13:42h	Acrofase	12:55
% R	68.41	% R	67.72	% R	71.80	% R	69,50
p-value	< 0,001	p-value	< 0,001	p-value	< 0,001	p-value	< 0,001

TABELA VIII - Tabela dos resultados obtidos a partir do tratamento estatístico do Método Cosinor. Dados da colônia controle submetida ao claro/escuro ambiental (14 dias). **A-** Análise do primeiro bloco (5 primeiros dias). **B-** Análise do segundo bloco (5 dias). **C-** Análise do terceiro bloco (5 dias).

COLÔNIA CONTROLE					
A		B		C	
Período: 24h		Período: 24h		Período: 24h	
Mesor	323.71	Mesor	245.73	Mesor	260.64
Amplitude	355.32	Amplitude	274.93	Amplitude	282.94
Acrofase	11:25h	Acrofase	12:44h	Acrofase	12:10h
% R	71.72	% R	66.02	% R	73.03
p-value	< 0,001	p-value	< 0,001	p-value	< 0,001

TABELA IX - Resultados obtidos a partir do tratamento estatístico do Método Cosinor. Dados da colônia controle submetida ao claro/escuro ambiental (14 dias). **A-** Análise do primeiro bloco (7 primeiros dias). **B-** Análise do segundo bloco de 7 dias.

COLÔNIA CONTROLE			
A		B	
Período: 24h		Período: 24h	
Mesor	323.03	Mesor	232.68
Amplitude	333.92	Amplitude	272.81
Acrofase	11:43h	Acrofase	12:28h
% R	67.84	% R	73.19
p-value	< 0,001	p-value	< 0,001

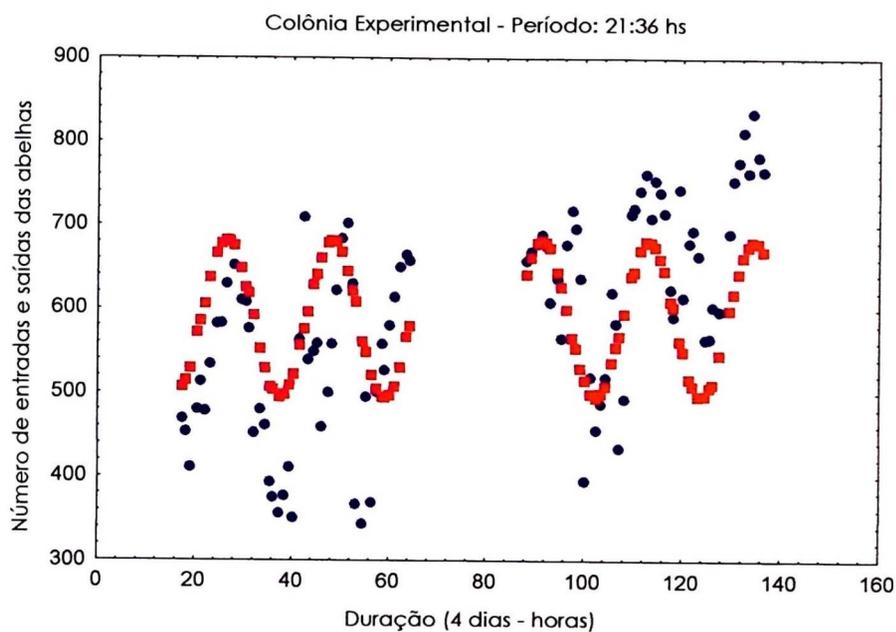


FIGURA 14 – Representação gráfica da análise do terceiro bloco de análises de 4 dias. Os círculos azuis representam os dados obtidos, enquanto que os quadrados vermelhos são os dados tratados pelo método estatístico Cosinor. A interrupção das curvas no intervalo em torno das 80 horas de experimento, reflete uma falha no sistema de coleta de dados.

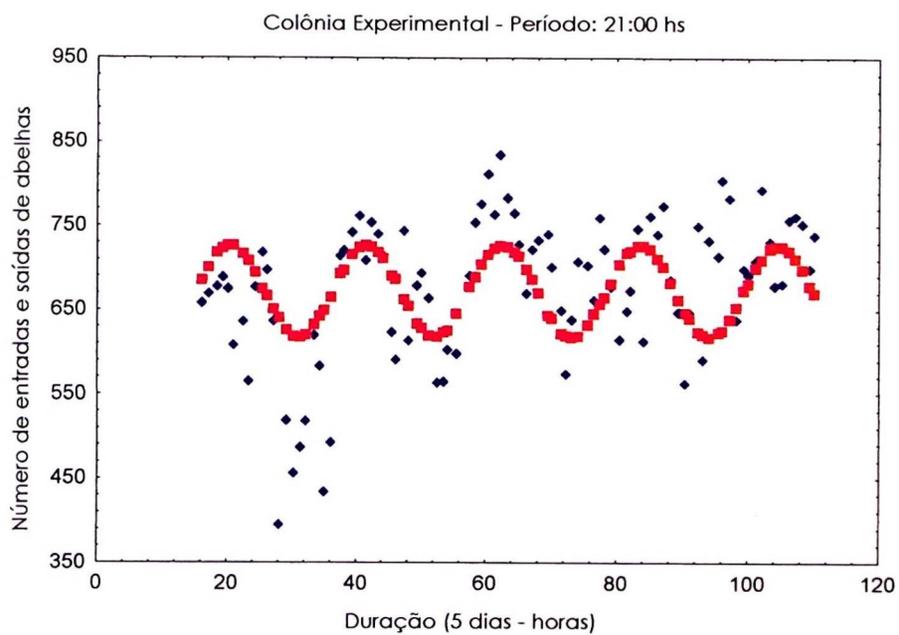


FIGURA 15 – Representação gráfica da análise do terceiro bloco de análises de 5 dias. Os losangos azuis representam os dados, enquanto que os quadrados vermelhos, os dados tratados pelo método estatístico Cosinor.

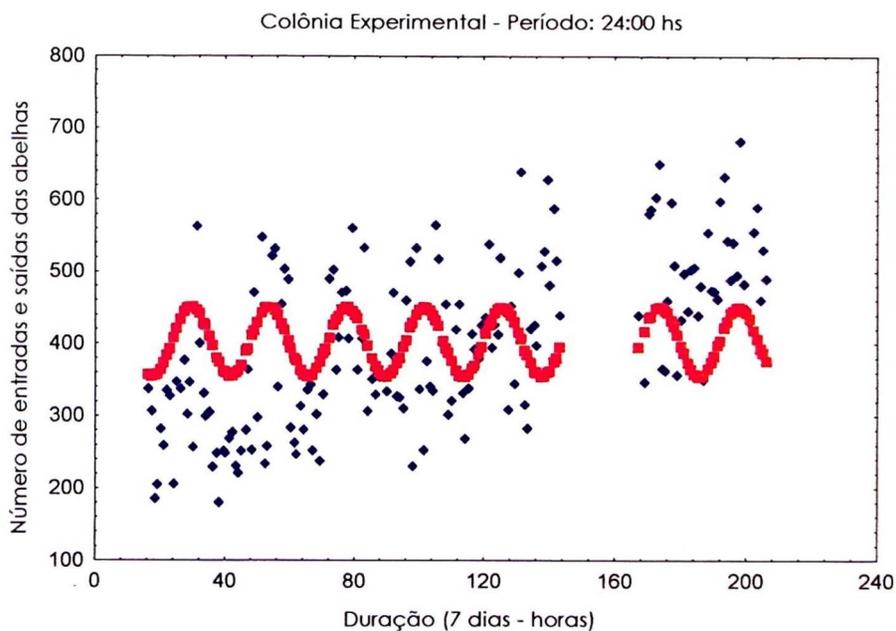


FIGURA 16 – Representação gráfica da análise do primeiro bloco de análises de 7 dias. Os losangos azuis representam os dados obtidos, enquanto que os quadrados vermelhos são os dados tratados pelo método estatístico Cosinor. A interrupção das curvas no intervalo em torno das 160 horas de experimento, reflete uma falha no sistema de coleta de dados.

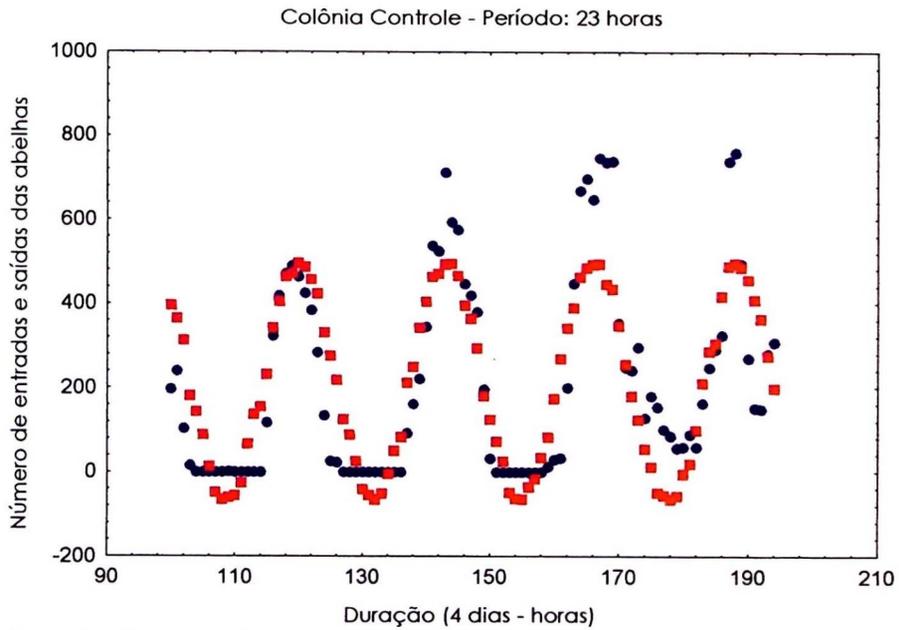


FIGURA 17 – Representação gráfica da análise dos primeiros 4 dias sob claro/escuro ambiental. Os círculos azuis representam os dados obtidos e os quadrados vermelhos são os dados tratados pelo método Cosinor.

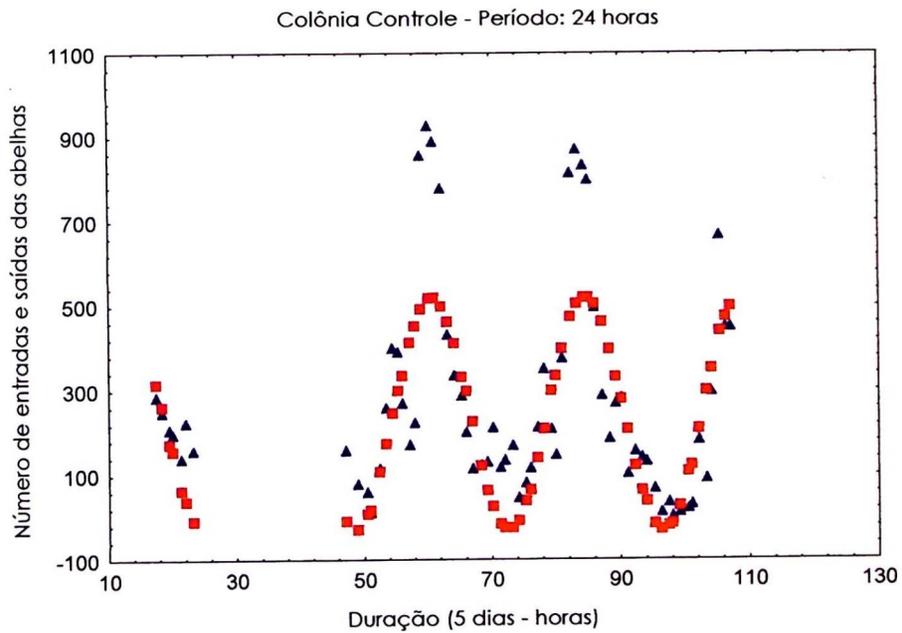


FIGURA 18 – Representação gráfica da análise do segundo bloco de 5 dias sob claro/escuro ambiental. Os triângulos azuis representam os dados obtidos e os quadrados vermelhos são os dados tratados pelo método Cosinor.

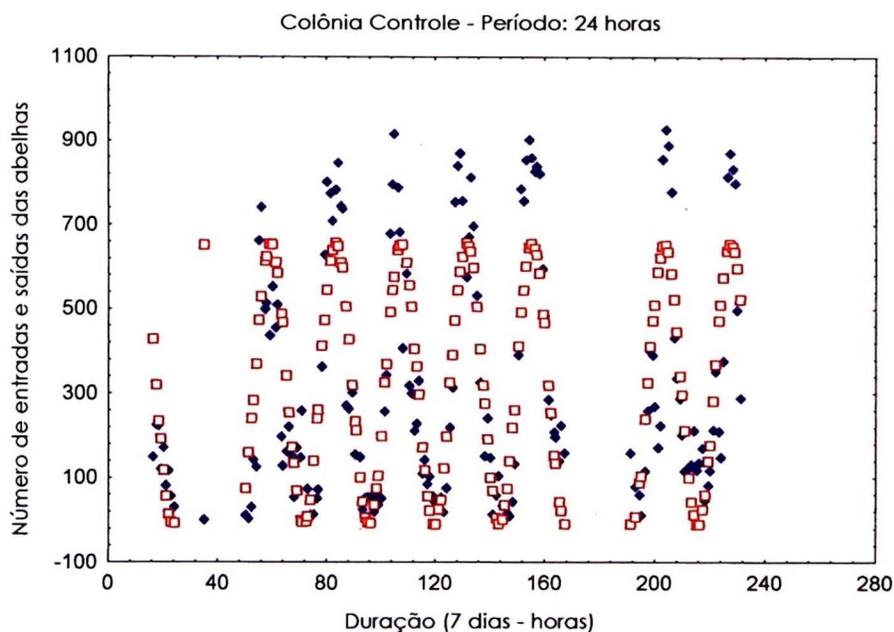


FIGURA 19 – Representação gráfica da análise do primeiro bloco de análises de 7 dias sob claro/escuro ambiental. Os losangos azuis representam os dados obtidos e os quadrados vermelhos são os dados tratados pelo método Cosinor.

4.2.3 Registro Automático

O 'software' foi especificamente elaborado para a execução deste experimento. Este programa coletava dados a cada 15 minutos porém, a cada 24 horas tinha que ser reativado, de forma que a cada dia um registro era desprezado.

Houve um intervalo em que não existiu registro de dados, sendo representado nos gráficos por uma descontinuidade das curvas (Figuras 14 e 16).

V. DISCUSSÃO

5.1 Condições Experimentais

Com relação ao experimento I, a principal dificuldade foi manter a temperatura numa faixa mínima de variação. Conservar a temperatura constante dentro da gaiola foi uma tarefa praticamente impossível, com os nossos recursos. Os fatores que provocaram esta variação de temperatura foram: a) o uso de uma lâmpada incandescente (100W); b) a localização externa da gaiola; c) o revestimento da gaiola com plástico preto e d) a temperatura ambiente elevada durante o dia.

A colônia experimental submetida a estas condições apresentou ritmo altamente significativo, sendo que o gráfico mostra que a curva esperada é muito semelhante à curva dos dados obtidos. Talvez a flutuação da temperatura (apresentada no item Resultados) tenha atuado como sincronizador secundário ou como modulador do ritmo. Assim sendo, era ainda possível falar em caráter endógeno do ritmo de atividade apenas com estes dados.

No experimento II, este problema foi sanado já que a gaiola foi colocada no interior do laboratório, evitando-se o aquecimento externo. Mesmo assim, a temperatura continuava oscilando, sendo então necessário acoplar um sistema de ventilação que manteve a temperatura constante.

Neste experimento, os resultados mostraram um ritmo endógeno significativo, porém a curva dos dados obtidos não se apresenta perfeitamente ajustada à curva esperada, já que muitos pontos (dados observados) não se enquadram à esta curva,

porque o teste estatístico exhibe diferenças na amplitude do ritmo no tratamento de séries temporais numa população.

O sistema de ventilação provavelmente não influenciou nestes resultados pois, as abelhas saíam normalmente do balão e o próprio revestimento deste (organza), eventualmente protegeu da ação do vento que pudesse alterar o comportamento de saída das operárias. Este expediente foi aplicado porque a literatura mostra que a velocidade do vento pode influenciar a atividade das abelhas (HEARD & HENDRIKZ, 1993; KLEINERT-GIOVANNINI & IMPERATRIZ-FONSECA, 1986).

Com relação à tomada de dados no experimento I, originalmente o registro seria feito através da observação direta dos tubos de saída da colônia experimental e controle com contagem simples dos indivíduos. Porém, percebeu-se a dificuldade deste procedimento, visto que havia uma movimentação intensa no tubo dificultando a visualização das abelhas.

Optou-se então, pelo registro através de filmagens em fitas de vídeo, possibilitando o congelamento das imagens e facilitando a contagem. Em algumas tomadas, a concentração de indivíduos era muito alta e neste caso, fez-se uma estimativa aproximada do número de indivíduos, a partir da área do tubo.

A coleta de dados do experimento II foi feita através de registro automático e o equipamento utilizado teve bom desempenho, de maneira geral. Apesar do tubo que continha as células fotoelétricas possuir duas vias (uma entrada e uma saída), não foi possível discriminar estas duas atividades, já que uma via foi obstruída pelas operárias.

5.2 Ritmo de Atividade/Repouso

As forrageadoras de *S. aff. depilis* mostram um padrão rítmico evidente da atividade de coleta, quando em condições naturais. Do mesmo modo que as forrageadoras da maior parte das espécies de abelhas, elas concentram sua atividade durante a fotofase e permanecem no ninho durante o escuro. A atividade está estritamente associada à oferta de recursos necessários à manutenção da colônia. A

regulação desta atividade está associada a estímulos intra e extra coloniais que pode ser estimada a partir da atividade observada na entrada da colônia (GARY, 1967).

De acordo com diversos autores, ASCHOFF (1981) entre eles, a antecipação do início da atividade, por exemplo, com relação ao ciclo ambiental, pode ser um indício do caráter endógeno do ritmo atividade/repouso. Também, a antecipação permite aos organismos estarem preparados fisiologicamente no momento em que a atividade começa (ASCHOFF, 1986). De fato, a antecipação do início da atividade de forrageamento já foi detectada em um grande número de espécies de abelhas. AZEVEDO (1997) observou que em *Partamona helleri* houve um pico de atividade às 4:30 h nos meses quentes. Esta atividade caracteriza-se pelo movimento das abelhas na entrada do ninho e, conforme a intensidade luminosa aumenta, elas passam a realizar vôos curtos em frente à colônia, sendo que o número de vôos vai aumentando à medida que o dia vai clareando. Este tipo de comportamento também foi observado em *A. m. adansonii*, em que WOYKE (1992) observou que nos meses de verão, as abelhas começavam a caminhar às 5:00 h; algumas faziam vôos curtos, quando ainda estava escuro. No inverno, todos os fenômenos aconteceram 15 min mais tarde de manhã e 15 min mais cedo à noite. Também foi observada antecipação com relação à disponibilidade de recursos da flor visitada. GIMENES *et al.* (1996) mostraram que a abelha solitária *Tetraglossula* começa a visitar as flores de *L. elegans*, antes mesmo da abertura das anteras, processo este que as abelhas aceleram, cortando a base das anteras com suas mandíbulas. O fato de neste trabalho, a acrofase do ritmo de atividade ter sido em torno de 3:18h é uma indicação de que *S. aff. depilis* também antecipa o início de sua atividade em relação ao nascer do Sol.

É interessante observar que as abelhas antecipam o início da atividade com relação a dois 'zeitgebers': claro/escuro e disponibilidade de alimento.

A atividade antecipatória encontrada em *A. m. capensis* é representada por uma chegada à fonte alimentar, antes desta estar disponível, tal como FOREL (1910 citado em SAUNDERS, 1982) observou, propondo que as abelhas deveriam possuir uma memória temporal, 'Zeitgedächtnis'. A evidência da natureza endógena e circadiana da

memória temporal, foi demonstrada, e nessa espécie, o ritmo em livre curso em claro constante, tem (τ) menor que 24 h. Além disso, esta memória temporal, encontra-se dentro da designação dada por PITTENDRIGH (1958) de "relógio continuamente consultado", já que as abelhas podem ser treinadas para visitar a fonte alimentar a qualquer hora do dia.

Em *S. aff. depilis* também foi observada movimentação antecipada pelo tubo, e esta pode estar relacionada a um processo de termorregulação para os primeiros vôos, já que neste horário a temperatura ainda é baixa, assim como, a intensidade luminosa.

5.2.1 Ritmo em Livre Curso

ASCHOFF (1960) discute que a condição ambiental constante influencia as características do ritmo em livre-curso. Dependendo da espécie, as modificações podem ser grandes e mesmo a expressão rítmica suprimida (mascaramento negativo) em determinadas intensidades luminosas ou em escuro constante. HONG & SAUNDERS (1994) observaram arritmicidade da atividade locomotora na mosca *Calliphora vicina* em relação à atividade locomotora em claro constante, com intensidade luminosa de 20,6 lux. Abaixo deste limiar, o ritmo de atividade persistiu com um período endógeno (τ) maior do que no escuro constante, sendo que esta espécie é diurna. Estes estudos sugerem que a luz não reduziu a amplitude do oscilador para zero pois, o relógio continuou em movimento, tanto que quando as moscas foram transferidas para o escuro constante apresentaram um aumento do (τ). SCHOFIELD & BRADY (1996) estudando o padrão de atividade circadiana em *Stomoxys calcitrans* observaram que as moscas não apresentaram ritmicidade evidente nas condições de claro constante. A atividade aumentou lentamente, permanecendo assim por várias horas e posteriormente começou a declinar. De acordo com SPANGLER (1974), a condição de claro constante também não é adequada para a manifestação do ritmo em livre-curso de abelhas recém-emergidas. Segundo MOORE & RANKIN (1985), o (τ) das abelhas isoladas foi maior

na condição de claro constante do que na de escuro constante. Em contraste, as abelhas que estão na colônia no seu próprio claro-escuro (claro constante fora da colônia), o (τ) foi levemente menor que 24 h, corroborando os dados obtidos neste trabalho. Nas duas condições experimentais adotadas (experimentos I e II), a condição constante foi a de claro e em ambas o (τ) foi menor que 24 h.

5.2.1.1 Interferências Detectadas

5.2.1.1.1 Pós-efeito do Arrastamento Prévio

O ritmo em livre curso na condição de claro constante, pode apresentar pós-efeito do regime imediatamente precedente ao estado estabilizado do livre curso pois, o oscilador sincronizado tende a conservar uma diferença de ângulo de fase definida em relação ao 'zeitgeber' (ASCHOFF, 1960). Esta pode ser a explicação para a grande aglomeração (aproximadamente 65 indivíduos), por volta das 4:00 h, observada no primeiro dia do experimento I. Provavelmente, as abelhas estavam prontas para os primeiros vôos de forrageamento, porém como o tubo estava vedado, ficaram apenas concentradas junto à saída. Normalmente, *S. aff. depilis* apresenta um pico de abundância nas flores das 10:00 às 16:00 h, assim como *S. postica* e *Tetragonisca angustula* (MATEUS, 1998). Do mesmo modo, a baixa movimentação observada no registro das 19 h deve também estar relacionada ao pós-efeito, já que neste horário as abelhas não estão em atividade normalmente.

No experimento II, a duração do pós-efeito pode ser melhor monitorada, devido à maior duração dos registros. Neste experimento, as abelhas da colônia controle saíam para o meio ambiente enquanto que, as da colônia experimental tinham acesso a outro compartimento em forma de balão, conectado ao tubo que continha a célula fotoelétrica. Para efeito de análise, o experimento foi quebrado em blocos de 4, 5 e 7 dias, afim de permitir uma melhor compreensão do fenômeno.

Na primeira parte, o período do ritmo em livre curso foi de aproximadamente 24 h em todas as análises. Análises feitas com grupos de 4 dias ($\tau = 24,36$ h), de 5 dias ($\tau = 24$ h) e na de 7 dias ($\tau = 24$ h) sendo que os grupamentos de 4 e 5 dias mostraram porcentagem rítmica significativa, que foi mais baixa, mas ainda é mais significativa no grupamento de 7 dias. Isto provavelmente deve-se ao pós-efeito, já que o oscilador tenta preservar a periodicidade do arrastamento nos ciclos anteriores. O período (T) de qualquer ciclo arrastado causa um pós-efeito no período do oscilador, quando T é de 24 h. Estudos feitos com roedores arrastados por um ciclo (CE) 12:12 h, os valores de (τ) na primeira parte do ritmo em livre curso eram basicamente de 24 h, porém no decorrer do tempo, ele variava de acordo com as características do estado estabilizado (PITTENDRIGH & DAAN, 1976). Neste caso, a análise da somatória das entradas e saídas caracterizou um ritmo circadiano, sendo que o período do ritmo em livre curso (τ) total foi de aproximadamente 23 h. A colônia controle apresentou uma ritmicidade circadiana de aproximadamente 24 horas com acrofase ocorrendo das 11:17 às 12:55 h.

5.2.1.1.2 Influência da Iluminação

No caso de *S. aff. depilis* também parece haver uma forte influência da luz. A intensidade luminosa é um dos fatores determinantes da atividade. De acordo com os estudos sobre atividade de vôo em *Apis* sp, NELSON & JAY (1967) observaram que a intensidade de 2000 - 4000 lux e temperatura de 26° a 32°C forneceram boas condições para o vôo, e que o aumento da intensidade luminosa tanto no verão quanto no inverno provocou aumento desta atividade dentro de uma sala de vôo. No primeiro experimento, a fonte luminosa de aproximadamente 2000 lux estava no teto da gaiola enquanto que no segundo experimento, a fonte também de 2000 lux foi colocada no chão desta; mesmo com o revestimento de papel alumínio refletindo a luz para todas as partes, as abelhas apresentaram fototaxia positiva e concentraram-se na região do balão, próxima à fonte.

Outra evidência é a observação, também no experimento I, de que durante a noite na colônia controle não havia movimentação, as abelhas simplesmente ficavam paradas no tubo com raras exceções.

5.2.1.1.3 Influência da temperatura

Apesar dos ritmos circadianos terem seu período (τ) compensado a variações de temperatura, como foi dito na Introdução, eles respondem a variações da temperatura ambiental ou a pulsos na forma de aumentos ou diminuições da amplitude do ritmo. Esta resposta é uma forma de mascaramento do ritmo (ASCHOFF, 1960). A influência da temperatura é notada em todos os grupos de invertebrados e vertebrados, mas é mais evidente nos pecilotermos, portanto é de se esperar que as abelhas sejam particularmente sensíveis a ela. Na literatura não-cronobiológica a maioria dos autores colocam este fator como o principal determinante da atividade de vôo. Segundo IMPERATRIZ-FONSECA *et al.* (1985), a temperatura ideal para a atividade de vôo de *Plebeia remota* varia entre 22° e 29°C, sendo que a temperatura mínima para a saída das abelhas é de 18°C. Estas abelhas também apresentaram um aumento desta atividade quando a temperatura esteve entre 33° e 34°C.

AZEVEDO (1997), estudando *Partamona helleri* observou que a temperatura atuou como fator determinante dos padrões de atividade de vôo destas abelhas, já que para iniciar a atividade a temperatura exigida era de pelo menos 14°C (uma das mais baixas registradas entre as espécies da tribo Trigonini), superada pela *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* que inicia a 13°C.

Abaixo de 18°C nenhuma atividade foi observada em *P. saiqui* e *P. remota*; de 19°C, em *P. droryana* e *P. emerina* (OLIVEIRA, 1973; KLEINERT-GIOVANINNI, 1982; IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 1985) e para *T. carbonaria*, 18°C (HEARD & HENDRIKZ, 1993); *M. marginata marginata*, 16° a 17°C e *M. marginata obscurior*, 17° a 18°C (KLEINERT-GIOVANINNI & IMPERATRIZ-FONSECA, 1986);

Tetragonisca angustula, 17° a 24°C (IWAMA, 1977). Entretanto, as abelhas do gênero *Bombus* podem voar a temperaturas extremamente baixas em torno de 5°C, devido ao mecanismo de produção de calor interno por meio da contração dos músculos indiretos do vôo (HEINRICH, 1972).

S. aff. depilis, no primeiro experimento sob a condição de claro constante, apresentou maior número de indivíduos no tubo da colônia experimental na temperatura de 34°C, quando comparada com a controle. Por outro lado, acima de 34°C observou-se uma pequena redução da quantidade de indivíduos em relação à controle.

O número de abelhas no tubo da colônia experimental foi baixo por volta das 13 h e esta redução na amplitude pode ser atribuída ao efeito mascarador da temperatura, já que o mascaramento capacita o organismo a agir imediatamente e de modo apropriado frente às mudanças ambientais, interagindo com a ritmicidade produzida internamente (RIETVELD *et al.*, 1993). Como a gaiola estava localizada externamente ao laboratório, em contato direto com os raios solares, o aquecimento foi inevitável, já que o revestimento externo era de plástico lona preto que absorvia calor. Posteriormente, durante todo o experimento a movimentação foi grande, incluindo caminhadas e pequenos vôos.

Este efeito evidente da temperatura foi uma das razões para mudar as condições experimentais no experimento II, transferindo a gaiola para o ambiente do laboratório, com temperatura controlada.

5.2.1.1.4 Influência de fatores bióticos

Como mencionado anteriormente, a atividade das forrageadoras está estreitamente associada à disponibilidade de recursos necessários à manutenção da colônia; conseqüentemente, estes recursos disponíveis dependem da conjunção destes com fatores climáticos favoráveis. Portanto, a existência de uma memória temporal controlada por um ritmo circadiano endógeno possibilita às forrageadoras visitarem uma

fonte de recursos à mesma hora todos os dias, promovendo ajustes entre os sistemas temporais de plantas e abelhas. Este fenômeno pode estar relacionado inclusive com a chamada constância floral. Os indivíduos (abelhas) não forrageiam ao acaso nas flores disponíveis, mas restringem suas visitas a determinadas espécies (MANNING, 1957). Forrageadoras de *Nannotrigona testaceicornis* parecem usar um número limitado de espécies florais baseadas mais na qualidade que na abundância (BEGO *et al.*, 1989). MICHENER (1974) destaca que a constância floral provavelmente deve promover a eficiência no forrageamento pois, a abelha pode trabalhar mais eficientemente se seus órgãos sensoriais e comportamento estiverem temporariamente ajustados para um tipo particular de flor da qual o alimento é obtido de um modo particular. LEHRER *et al.* (1995), estudando a percepção dos padrões de forma em forrageadoras, propôs que as abelhas respondem de forma inata a algumas características naturais das flores, sendo que a forma da flor age conjuntamente com a cor, fornecendo uma pista para a abelha identificar as fontes alimentares naturais.

Existem evidências de padrões temporais que determinam as atividades de abelhas visitantes a uma mesma espécie de planta. Estas evidências foram detectadas devido à clara separação das acrofases dos ritmos de coleta de pólen e néctar. De acordo com os estudos de GIMENES *et al.* (1993), as visitas de duas espécies de abelhas às flores de *Ludwigia elegans* ocorreram numa seqüência temporal e não há competição pelos recursos.

No caso de *S. aff. depilis*, o forte ritmo circadiano de atividade das forrageadoras aponta para a mesma influência das fontes de alimento.

Além do alimento, a própria atividade do grupo social parece ter influência no padrão rítmico da espécie. No experimento I, foi observado na colônia o transporte de material em bolinhas nas mandíbulas de determinadas operárias, do interior do ninho para o tubo, e como este estava vedado, elas retornavam para dentro da colônia. Não se pode afirmar se o material era lixo ou cerume, pois houve depósito de cerume na parede interna do tubo e na organza que o vedava. Este comportamento restringiu-se a intervalos bem delimitados, das 10:00 às 16:00 h, sendo que no último dia do

experimento esta atividade iniciou-se às 4:00 h. Infelizmente, não foi possível observar este comportamento na colônia experimental, devido à dificuldade da visualização de detalhes.

5.3 Características do Ritmo de atividade de *S. aff. depilis*

5.3.1 Livre-Curso

Os resultados do experimento II permitiram mostrar a existência de um ritmo endógeno, que controla as expressões da atividade e do repouso de *S. aff. depilis*. O isolamento da colônia de qualquer influência ambiental não provocou supressão da expressão rítmica. Passado os pós-efeitos, detectados pela análise dos dados dos primeiros 4-5 dias do experimento, notou-se uma desvinculação do oscilador da influência de um possível sincronizador. A análise do bloco seguinte de dados mostrou valores de (τ) de 23:36 h (bloco de 4 dias) e de 23:23 h (bloco de 5 dias), indicando ainda uma certa instabilidade devido aos **transientes**, estado que precede uma nova situação de estabilização (PITTENDRIGH *et al.*, 1958). Devido à labilidade do sistema neste intervalo, as porcentagens rítmicas são baixas e pouco significativas.

A porcentagem rítmica no último bloco da maioria das análises foi altamente significativa, indicando que o oscilador estava estabilizado e o valor de (τ) para a espécie é de 21:36 h, tal como mostrado quando os dados foram reunidos em grupos de 4 dias.

5.3.2. Arrastamento

Apesar dos ciclos ambientais de temperatura, umidade relativa, pluviosidade e ventos, serem importantes, em graus variáveis, para a sincronização ou modulação dos ritmos biológicos, o ciclo claro-escuro é o mais importante para a maioria das espécies,

tanto de plantas como de animais. Este ciclo, também para diversas espécies de abelhas estudadas até o momento, é o mais importante. MOORE & RANKIN (1993) observaram que o ritmo circadiano locomotor de forrageadoras de *A. m. ligustica* expostas a diversos ciclos de claro/escuro apresentaram uma correlação com a transição claro/escuro e que esta atuou como 'zeitgeber' principal.

O período endógeno - τ - de cerca de 23 h de *S. aff. depilis* é finamente ajustado ao ciclo ambiental de 24 h pelo ciclo claro/escuro. Apesar desta evidência, não se pode descartar a possível participação do ciclo de temperatura. As respostas das abelhas a certos níveis de temperatura detectadas neste trabalho e explicadas como respostas a mascaramento, podem também ser resultados da ação do arrastamento acessório promovido pelo ciclo quente/frio, que atuaria como um 'zeitgeber' secundário. O esclarecimento deste ponto e da ação de outros fatores ambientais bióticos e abióticos depende da aplicação de protocolos experimentais planejados especificamente para esse fim.

No primeiro dia de experimento, a colônia controle apresentou uma grande aglomeração.

Apenas no primeiro registro que teve início às 19 h, a colônia experimental apresentou pouca movimentação. Este comportamento pode estar relacionado com o pós-efeito, já que neste horário as abelhas não estão em atividade normalmente. Na colônia controle, durante a noite não havia movimentação, as abelhas simplesmente ficavam paradas no tubo com raras exceções, 2 ou 3 indivíduos que caminhavam.

No experimento II, a análise de 4 e 5 dias apresentou uma porcentagem rítmica significativa, enquanto que na de 7 dias esta porcentagem foi baixa porém, significativa. A acrofase do primeiro bloco concentrou-se no intervalo das 5:15 às 6:28 h em todos os blocos, muito próxima inclusive da encontrada na colônia controle, corroborando a possível influência do 'zeitgeber' nos ciclos anteriores.

No bloco intermediário, os valores dos períodos em livre curso na análise feita a cada 4 e 5 dias são respectivamente, 22:36 h e 23:23 h. Neste ponto, o oscilador começou a se desvincular da influência de um possível sincronizador e os ciclos

tomaram-se instáveis devido ao deslocamento de fase, e à ocorrência de transientes, que estão antecedendo um novo estado estabilizado (PITTENDRIGH *et al.*, 1958). Em consequência da labilidade do sistema neste intervalo, as porcentagens rítmicas são baixas e pouco significativas.

No último bloco de análises a cada 4, 5 e 7 dias o (τ) foi respectivamente de 21:36 h, 21 h e 22 h. De acordo com estes dados, pode-se observar que o período do ritmo em livre curso nas análises de 4 e 5 dias, apresentaram uma porcentagem rítmica altamente significativa, enquanto que na análise a cada 7 dias, a porcentagem rítmica foi baixa, porém significativa. Este último caso pode ser devido à quebra da análise em apenas dois blocos, sendo que no último bloco estão englobados os ciclos de transientes.

Com relação às acrofases, as análises de 4 e 7 dias foram próximas, 5:09 e 4:18 h respectivamente; enquanto que na de 5 dias ocorreu às 20:40 h.

Além da intensidade luminosa, outro fator que merece destaque é a temperatura pois, são fatores preponderantes na sincronização da atividade, de acordo com estudos efetuados até agora. Pode-se incluir também, a umidade relativa, a chuva e o vento. Existem evidências de padrões cronobiológicos para as atividades dos visitantes, dados pela clara separação das acrofases de ritmos de coleta de pólen e néctar na mesma espécie. De acordo com estudos de GIMENES *et al.* (1993), há uma relação entre a planta *L. elegans* e as abelhas *T. bigamica* e *P. brasiliensis* devido a um padrão temporal de separação das duas últimas espécies na natureza.

Nem todos os possíveis 'zeitgebers' são igualmente efetivos. Luz e temperatura são os principais parâmetros do ambiente para os quais os organismos estão adaptados (ASCHOFF, 1960). Neste experimento, o ciclo claro/escuro é o 'zeitgeber' preponderante na sincronização do ritmo de atividade/repouso em *S. aff. depilis*, cujo (τ) foi medido e ficou em torno de 23 horas.

VI. CONCLUSÕES

S. aff. depilis apresenta ritmicidade endógena evidente com τ de aproximadamente 23 h, na condição de claro constante. Apesar desta condição ser não permissiva para um grande número de espécies. Os dados deste experimento corroboraram outros trabalhos que resultaram num τ ligeiramente menor que 24 h, quando as abelhas foram submetidas ao seu próprio claro/escuro (claro constante fora do ninho).

As abelhas apresentaram atividade antecipatória, observada através da movimentação antecipada no tubo de saída da colônia, mesmo não havendo níveis ótimos de temperatura e de intensidade luminosa, para esta atividade.

Além disso, apresentaram fototaxia. A temperatura apresentou-se como fator modulador que pode atuar como 'zeitgeber' secundário, porém o claro/escuro sem dúvida, é o principal 'zeitgeber', na sincronização do ritmo de atividade/repouso das forrageadoras desta espécie.

VII RESUMO

O período em livre-curso de atividade/repouso de forrageadoras de *S.aff. depilis* (Moure, 1942) foi de aproximadamente 23 h, sob claro constante.

As abelhas arrastadas ao fotoperíodo natural, exibem um padrão diário de atividade concentrada na fotofase, sendo o ciclo claro/escuro, o principal 'zeitgeber'.

S. aff. Depilis apresenta fototaxia evidente e atividade antecipatória, observada através da movimentação no tubo de saída, mesmo não havendo intensidade luminosa suficiente e níveis de temperatura ótimos.

VII. RESUMO

O período do ritmo de atividade/repouso em livre-curso das forrageadoras de *S. aff. depilis* (Moure, 1942) foi de aproximadamente 23 h sob claro constante.

As abelhas arrastadas ao fotoperíodo natural, exibem um padrão diário de atividade concentrado na fotofase, sendo o ciclo claro/escuro, o principal 'zeitgeber'.

S. aff. depilis apresenta fototaxia evidente e atividade antecipatória, sendo que esta última foi observada através da movimentação no tubo de saída, mesmo quando não havia intensidade luminosa suficiente e níveis de temperatura ótimos.

VIII. SUMMARY

The free-running period of activity and rest in foragers of *S. aff. depilis* (Mourø, 1942) is approximately 23 h under constant light.

When entrained to the natural photoperiod, the activity is more precisely restricted to the photophase segment of the entraining cycle. Thus the circadian rhythm is the principal 'zeitgeber'.

Through observations of the activity in the exit-tube it could be shown, that evident phototaxis and anticipatory behaviour occurs in *S. aff. depilis*. The anticipatory behaviour is displayed even under not optimal conditions of light and temperature

IX. GLOSSÁRIO

9.1 TERMOS CRONOBIOLOGICOS

-ACROFASE - Medida de tempo transcorrido entre um instante (fase) de referência e a fase na qual é maior a probabilidade de ser encontrado o valor mais elevado de uma variável, a partir da curva senoidal ajustada aos dados. Expressa-se em unidades de tempo (horas, minutos, segundos, etc), ângulo ou episódio fisiológico (como batimentos cardíacos).

-ADAPTAÇÃO TEMPORAL - Processo de ajuste de ritmos biológicos a ciclos ambientais ou do próprio organismo.

-AGENTE MASCARADOR - Evento que modifica a expressão de um ritmo biológico, aumentando (mascaramento positivo) ou diminuindo (mascaramento negativo) essa expressão.

-AMPLITUDE - Valor da diferença entre os valores máximo (ou mínimo) e médio (Mesor) da curva ajustada de um ritmo biológico qualquer.

-ÂNGULO DE FASE - Diferença temporal entre (por exemplo, a diferença entre o despertar a fase de um evento e a fase do outro evento e o amanhecer), podendo ser expresso em unidades de tempo (horas, minutos, etc) ou em frações de período (um quarto de ciclo, por exemplo).

-ARRASTAMENTO - Sincronização (sinônimo). Ajuste temporal de um ritmo por um outro ritmo. Mais comumente, refere-se ao processo de ajuste temporal de organismos a ciclos ambientais (como a sincronização do ritmo da temperatura central com o

-ESCOTOFASE - Fase de escuro de um ciclo claro/escuro, noite.

-FASE - Momento determinado de um ciclo, pode referir-se a uma metade do ciclo, por exemplo, a fase clara do ciclo claro/escuro, ou a um momento pontual, como o valor máximo de uma variável.

-FASE DE CLARO - No ciclo claro/escuro, a fase clara; dia.

-FASE DE ESCURO - No ciclo claro/escuro, a fase escura; noite.

-FOTOFASE - Fase de claro de um ciclo claro/escuro; dia.

-FOTOPERÍODO - Tamanho (duração) de um ciclo claro/escuro. Refere-se, geralmente, ao ciclo dia/noite de 24h, especialmente à proporção horas de claro/horas de escuro, por exemplo, ciclo CE 12:12.

-HORA CIRCADIANA - Fase de um ritmo circadiano em situação de livre-curso. Geralmente, torna-se o início do "dia subjetivo" como hora circadiana zero. Em um ritmo, cujo período em livre-curso seja 25h, cada hora circadiana valerá 25/24 horas.

-LIVRE-CURSO - Diz-se da situação na qual são eliminadas oscilações externas (um laboratório sob iluminação constante, 24h/dia) e dos ritmos biológicos observados nessa situação.

-MASCARAMENTO - Processo de modificação da expressão de um ritmo biológico.

-NOITE - Fase escura do ciclo dia/noite de 24h.

-OSCILAÇÃO - Mudança de estado ou de valor de uma variável.

-PERÍODO - Duração de um evento. Em cronobiologia, utiliza-se para identificar a duração de um ciclo. Usa-se a letra "T" para identificar ciclos impostos a um determinado sistema biológico.

-PERÍODO EM LIVRE-CURSO - Duração de um ciclo em situação de livre-curso, em geral distinta da duração do mesmo ciclo em condições normais de sincronização.

-PERÍODO ENDÓGENO - Duração de um ciclo determinada pelos mecanismos endógenos (relógios biológicos).

-PÓS-EFEITO - Características de um ritmo biológico que derivam de condições de pré-tratamento, tais como transientes de fase ou alterações do período.

-RELÓGIO BIOLÓGICO - Estrutura capaz de produzir oscilações regulares que sirvam como mecanismos temporizadores do organismo, cujo período seja relativamente estável sob diversas condições de temperatura e que seja capaz de sincronizar com ciclos ambientais.

-RITMO - Qualquer evento que se repete regularmente.

-RITMO BIOLÓGICO - Evento biológico que se repete regularmente. Alguns autores restringem o uso de ritmos biológicos aos ritmos cuja determinação endógena esteja comprovada. Outros propõem que a denominação seja atribuída apenas aos ritmos associados a ciclos ambientais.

-SENTIDO TEMPORAL (ZEITSINN) OU "MEMÓRIA TEMPORAL" (ZEITGEDÄCHTNIS) - Capacidade dos organismos de ajustar seu comportamento a determinada hora do dia; uma forma de condicionamento temporal que envolve consulta a mecanismos temporizadores endógenos. Os termos em alemão são usados correntemente.

-SINCRONIZAÇÃO - Sinônimo: arrastamento. Tipicamente, ajuste de um ritmo a um ciclo ambiental, como, por exemplo, o ajuste do ciclo atividade/repouso ao claro/escuro ambiental.

-SINCRONIZADOR - Sinônimo: agente arrastador, *Zeitgeber*. Agente (ciclo) arrastador.

-TRANSIENTE - Ciclo ou conjunto de ciclos com período instável devido a um deslocamento de fases, como ocorre quando nos subtemos a uma mudança de fuso horário de 12h.

-ZEITGEBER - Termo alemão de uso consagrado. Literalmente "doador de tempo". Proposta de tradução de Cesar Timo-laria: Cronador.

9.2 Símbolos

(A) - Amplitude

(CC) - Representação da condição constante de iluminação

(CE) - Ciclo claro-escuro.

(CE 14:10) - Ciclo de 24h com 14h de claro e 10h de escuro.

(CT) - Hora circadiana.

(EE) - Representação de condição constante de escuro.

(φ) - Fase

(τ) - Período em livre-curso

(T) - Período do 'zeitgeber'.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFECHÉ, S. C. 1988. Conceitos fundamentais da ritmicidade biológica. *In: Introdução ao Estudo da Cronobiologia*. J. Cipolla-Neto, N. Marques & L. S. Menna-Barreto (eds.) São Paulo, Ícone. p. 34-63.
- ASCHOFF, J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Harbor Symp. Quant. Biol.* 25: 11-28
- _____ 1981. Freerunning and entrained circadian rhythms. *In: Handbook of Behavioral Neurobiology*. J. Aschoff (ed.), vol.4, **Biological Rhythms**. New York, Plenum Press. p. 81-93.
- _____ 1986. Anticipation of a daily meal: a process of 'learning' due to entrainment. *Monitore zool. ital.*, (N.S.) 20: 195-219.
- AZEVEDO, G. G. 1997. **Atividade de vôo e determinação do número de instares larvais em *Partamona helleri* (Fricse): (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. MG. 64 pp
- BEGO, L. R. 1977. **Aspectos da regulação social em *Nannotrigona* (*Scaptotrigona*) *postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. SP 180pp.
- BEGO, L. R.; MAETA, Y; TEZUKA, T. & ISHIDA, K. 1989. Floral preference and flower constancy of a brazilian stingless bee, *Nannotrigona testaceicornis* kept in a greenhouse. *Bull. Fac. Agr. Shimane Univ.*, 23: 46-54.
- BEIG, D. 1972. The production of males in queenright colonies of *Trigona* (*Scaptotrigona*) *postica*. *J. Apic. Res.*, 11(1): 33-39.
- BENEDITO-SILVA, A. A. 1988. Metodologia de análise matemática e estatística dos ritmos biológicos. *In: Introdução ao Estudo da Cronobiologia*. J.

- Cipolla-Neto, N. Marques & L. S. Menna-Barreto (eds.) São Paulo, Ícone. p. 50-63.
- BENEDITO-SILVA, A. A. 1997. Aspectos metodológicos da cronobiologia. **In: Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. N. Marques & L. Menna-Barreto (orgs.) São Paulo, Edusp. p. 215-238.
- BÜNNING, E. 1967. **The Physiological Clock**. 2ª edição. New York, Springer Verlag. 167 pp.
- CAMARGO, J. M. F. 1994. Biogeografia de Meliponini (Hymenoptera, Apidae, Apinae): a fauna Amazônica. **In: Encontro sobre Abelhas, Anais**, Ribeirão Preto, vol. 1, p. 46-59.
- CECCATO, S. 1970. **Divisão de trabalho entre as operárias de *Melipona rufiventris flavolineata* Friese (Hymenoptera, Apoidea)**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. SP. 58pp.
- CRUZ-LANDIM, C. & FERREIRA, A. 1968. Mandibular gland development and communication in field bees of *Trigona (Scaptotrigona) postica* (Hymenoptera:Apidae). **J. Kansas Ent. Soc.** 41(4): 474-481.
- D'ALBORE, G. C. R. 1988. Attività bottinatrice giornaliera di *Bombus* Latr. e *Psithyrus* Lep. (Hymenoptera, Apidae) in varie fasce altitudinali dell' Umbria e delle Marche. **Redia**, 71: 99-114.
- DARCHEN, M. R. & DELAGE, M. B. 1970. Physiologie des insectes – facteur déterminant les castes chez les Trigones (Hyménoptères apides). **C. R. Acad Sc. Paris**, t. 270: 1372-1373.
- ENGELS, W.; ROSENKRANZ, P. & ENGELS, E. 1995. Thermoregulation in the nest of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona postica* and a hypothesis on the evolution of temperature homeostasis in highly eusocial bees. **Stud. Neotrop. Fauna & Environm.**, 30(4): 193-205.
- FRISCH, B. & ASCHOFF, J. 1987. Circadian rhythms in honeybees: entrainment by feeding cycles. **Physiol. Ent.**, 12: 41 - 49.

- FRISCH, B. & KOENIGER, N. 1994. Social synchronization of the activity rhythms of honeybees within a colony. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, **35**: 91 - 98.
- GARY, N. E. 1967. Diurnal variations in the intensity of flight activity from honeybee colonies. **J. Apic. Res.** **6**(2): 65-68.
- GIANNINI, K. M. 1993. **Estudos etológicos em *Melipona compressipes fasciculata* Smith 1854, com especial ênfase ao processo de oviposição das células de cria.** Dissertação de Mestrado. FFCLRP. Universidade de São Paulo.SP. 114pp
- GIMENES, M.; BENEDITO-SILVA, A. A. & MARQUES, M. D. 1993. Chronobiologic aspects of a coadaptative process: the interaction of *Ludwigia elegans* flowers and their more frequent bee visitors. **Chronobiol. Int.**, **10**: 20-30.
- GIMENES, M.; BENEDITO-SILVA, A. A. & MARQUES, M. D. 1996. Circadian rhythms of pollen and nectar collection by bees on the flowers of *Ludwigia elegans* (Onagraceae). **Biol. Rhythm Res.**, **27**(3): 281-290.
- HALBERG, F.; JOHNSON, E. A.; NELSON, W.; RUNGE, W. & SOTHERN, R. 1972. Autorhythmometry procedures for physiologic self-measurements and their analysis. **Physiol. Teacher**, **1**: 1-11.
- HASTINGS, J. W. & SWEENEY, B. M. 1957. On the mechanism of temperature independence in a biological clock. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **43**: 804-811.
- HASTINGS, J. W.; RUSAK, B. & BOULOS, Z. 1991. Circadian rhythms: the physiology of biological timing. **In: Neural and Integrative Animal Physiology.** C. L. Prosser (org.). New York, Wiley-Liss, Inc. p. 435-546.
- HEARD T. A. & HENDRIKZ, J. K. 1993. Factors influencing flight activity of colonies of the stingless bee *Trigona carbonaria* (Hymenoptera: Apidae). **Aust. J. Zool.** **41**: 345-353.
- HEINRICH, B. 1972. Temperature regulation in the bumblebee *Bombus vagans*: a field study. **Science**, **175**: 185-187.

- HONG, S-F. & SAUNDERS, D. S. 1994. Effects of constant light on the rhythm of adult locomotor activity in the blowfly, *Calliphora vicina*. **Physiol. Ent.**, **19**: 319 - 324.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; PIRES, J. T. 1985. Climate variations influence on the flight of *Plebeia remota* Holmberg (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Rev. bras. Ent.**, **29**: 427-434.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. & OLIVEIRA, M. A. C. 1976. Observations on a queenless colony of *Plebeia saiqui* (Friese). **Bol. Zool. USP.**, v. **1**, p. 299-312.
- IWAMA, S. 1977. A influência de fatores climáticos na atividade externa de *Tetragonisca angustula* (Apidae, Meliponinae). **Bol. Zool. USP.**, **2**: 189-201.
- KERR, W. E. & ESCII, H. 1965. Comunicação entre as abelhas sociais brasileiras e sua contribuição para o entendimento da sua evolução. **Ciênc. e Cult.**, **17**(4): 529-538.
- KERR, W. E.; FERREIRA, A & MATOS, N. S. 1963. Communication among stingless bees: additional data. **J. New York Entomol. Soc.** **71**(2): 80-90.
- KLEINERT-GIOVANNINI, A. 1982. The influence of climatic factors on flight activity of *Plebeia emerina* Friese (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in winter. **Rev. bras. Ent.**, **26**: 1-13.
- KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 1986. Flight activity and responses to climatic conditions of two species of *Melipona marginata* Lep. (Apidae, Meliponinae). **J. Apic. Res.**, **25**: 3-8.
- LEHRER, M.; HORRIDGE, G. A.; ZHANG, S. W. & GADAGKAR, R. 1995. Shape of vision in bees: innate preference for flower-like patterns. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, **347**: 123-137.
- LINDAUER, M. & KERR, W. E. 1960. Communication between the workers of stingless bees. **Bee World**, **41**: 61-71.
- MANNING, A. 1956. Some aspects of the foraging behaviour of bumble-bees. **Behaviour**, **9**: 2-3.

- _____. 1957. Some evolutionary aspects of the flower constancy of bees. **Proc. Roy. Phys. Soc.**, **25** (3): 67-71.
- _____. 1992. **An Introduction to Animal Behaviour**. 4^a (ed.) Cambridge, Cambridge University Press. 196 pp.
- MARQUES, M. D. & WATERHOUSE, J. M. 1994. Masking and the evolution of circadian rhythmicity. **Chronobiol. Int.**, **11**: 146-155.
- MARQUES, M. D.; GOLOMBEK, D.; MORENO, C. 1997. Adaptação temporal. **In: Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. N. Marques & L. Menna-Barreto (orgs.). São Paulo, Edusp. p. 45 - 85.
- MATEUS, S. 1998. **Abundância relativa, fenologia e visita às flores pelos Apoidea do cerrado da Estação Ecológica de Jataí – Luiz Antônio – SP**. Dissertação de Mestrado. FFCLRP. Universidade de São Paulo. SP. 163 pp
- MENNA-BARRETO, L. 1997. O tempo na biologia. **In: Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. N. Marques & L. Menna-Barreto (eds.). São Paulo, Edusp. p. 17-21.
- MICHENER, C. D. 1974. **The Social Behavior of the Bees**. The Belknap Press, Harvard University. 404pp.
- MICHENER, C. D. 1990. Classification of the Apidae (Hymenoptera). Appendix *Trigona genalis* Friese, a hitherto unplaced New Guinea species (by C. D. Michener & S. F. Sakagami), **Univ. Kansas Sci. Bull.**, **54**: 75-164.
- MOORE, D. & RANKIN, M. A. 1985. Circadian locomotor rhythms in individual honeybees. **Physiol. Ent.**, **10**: 191 - 197.
- _____. 1993. Light and temperature entrainment of a locomotor rhythm in honeybees. **Physiol. Ent.**, **18**: 271 - 278.
- MORITZ, R. F. A. & SAKOFSKI, F. (1991). The role of the queen in circadian rhythms of honeybees (*Apis mellifera* L). **Behav. Ecol. Sociobiol.**, **29**: 361 - 487.
- NELSON, E. & JAY, S. C. 1967. Flight activity of honey bee in a flight and rearing room. I. The influence of light intensity. **J. Apic. Res.**, **6**: 179-183.

- NELSON, W.; TONG, Y. L.; LEE, J. K. & HALBERG, F. 1979. Methods for cosinor rhythmometry. **Chronobiologia**, **6**: 305-323.
- NOGUEIRA-FERREIRA, F. H. & SOARES, A. E. E. 1998. Male aggregations and mating flight in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Iheringia, Sér. Zool, Porto Alegre**, **84**: 141-144.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1970. **A Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão (Meliponinae)**. 2ª edição, São Paulo, Editora Chácaras e Quintais. 365 pp.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1997. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão**. São Paulo, Editora Nogucirapis. 446 pp.
- OLIVEIRA, M. A. C. 1973. **Algumas observações sobre a atividade externa de *Plebeia saiqui* e *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Meliponinae)**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. SP. 79 pp.
- PAGE, T. L. 1985. Clocks and circadian rhythms. **In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. vol.6. G A. Kerkut & L. I. Gilbert (eds.). Oxford, Pergamon Press. p. 577-652.
- PITTENDRIGH, C. S. 1958. Perspectives in the study of biological clocks. **In: Perspectives in Marine Biology**. A. A. Buzzati-Traverso. California: University of California Press. p. 239-268.
- PITTENDRIGH, C. S. 1960. Circadian rhythms and circadian organization of living systems. **Harbor Symp. Quant. Biol.**, **25**: 159 - 184.
- PITTENDRIGH, C. S. 1981. Entrainment. **In: Handbook of Behavioral Neurobiology**. J. Aschoff (ed.), **vol.4, Biological Rhythms**. New York, Plenum Press. p. 95-124.
- PITTENDRIGH, C. S.; BRUCE, V. G.; KAUS, P. 1958. On the significance of transients in daily rhythms. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, **44**: 965 - 973.
- PITTENDRIGH, C. S. & DAAN, S. 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. **J. comp. Physiol.**, **106(3)**: 223 - 252.

- RIETVELD, W. J., MINORS, D.S. & WATERHOUSE, J. M. 1993. Circadian rhythms and masking: an overview. **Chronobiol. Int.** **10**(4): 306-312.
- ROBINSON, G. 1992. Regulation of division of labor in insect societies. **Annu. Rev. Entomol.** **37**: 637-665.
- ROUBIK, D. W. 1990. Mate location and mate competition in males of stingless bees. **Entomol. Gener.**, **15**(2): 115-120.
- ROUBIK, D. W. 1992. **Ecology and natural history of tropical bees**. New York, Cambridge University Press, 514pp. (Cambridge Tropical Biology Series).
- SAKAGAMI, S. F. 1966. Techniques for the observation of behaviour and social organization of stingless bees by using a special hive. **Pap. Avul. Dep. Zool. Secr. Agric. S.P.**, **19**: 151-162.
- SAKAGAMI, S. F. 1982. **Social Insects**. *In*: Henry R. Hermann (ed.). Volume III. New York, Academic Press.. p.361-423.
- SAUNDERS, D. S. 1982. **Insect Clocks** . 2^a edição. Oxford, Pergamon Press. 409 pp.
- SCHOFIELD, S. & BRADY, J. 1996. Circadian activity pattern in the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. **Physiol. Ent.**, **21**: 159-163.
- SIMÕES, D. & BEGO, L. R. 1979. Estudo da regulação social em *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille em duas colônias (normal e com rainhas virgens) com especial referência ao polietismo etário. **Bolm. Zool.**, **4**: 89-98.
- SIMÕES, D & BEGO, L. R. 1991. Division of labor, average life span and life table in *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Naturalia**, **16**: 81-97.
- SOUTHWICK, E. E. & MORITZ, R. F. A. 1987. Social synchronization of circadian rhythms of metabolism in honeybees (*Apis mellifera*). **Physiol. Ent.**, **12**: 209 - 212.
- SPANGLER, H. G. 1972. Daily activity rhythms of individual worker and drone honey bees. **Ann. ent. Soc. Am.**, **66**: 1073-1076.

- WILLE, A. 1983. Biology of the stingless bees. **Ann. Rev. Entomol.**, **28**: 41- 64.
- WOYKE, J. 1992. Diurnal flight activity of African bees *Apis mellifera adansonii* in diferent seasons and zones of Ghana. **Apidologie**, **23**: 107-117.
- ZUCCHI, R. 1993. Ritualized dominance, evolution of the queen worker interactions and related aspects of the stingless bees (Hymenoptera, Apidae). **In: Evolution of Insect Societies**. T. Inoue & S. Yamane (eds.). Tokyo, Hakuhin-sha. p. 207-249.