

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**ROUSSEAU DA SILVA CAMPOS**

**Estudos comportamental e químico dos feromônios de trilha e marcação de território de *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939 (Hymenoptera: Formicidae)**

**Maceió**

**2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

ROUSSEAU DA SILVA CAMPOS

Estudos comportamental e químico dos feromônios de trilha e marcação de território  
de *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939 (Hymenoptera: Formicidae)

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto  
de Química e Biotecnologia da Universidade  
Federal de Alagoas, para fins de obtenção  
de título de Doutorado em Química e  
Biotecnologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ruth Rufino do  
Nascimento

Maceió

2012

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

C198e Campos, Rousseau da Silva.  
Estudos etológico e químico dos feromônios de trilha e  
marcação de território de *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939  
(Hymenoptera : Formicidae) / Rousseau da Silva Campos.  
– 2012.  
88 f. : il., tabs.

Orientadora: Ruth Rufino do Nascimento  
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade  
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió,  
2011.

Inclui bibliografia.

1. Formiga-cortadeira. 2. Saúva (Formiga). 3. *Atta opaciceps*.  
4. Feromônios. 5. Controle biológico. I. Título.

CDU: 595.796



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1384, Fax (82) 3214-1384  
email: cpqqb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de **Rousseau da Silva Campos**, intitulada: "**Estudos Etológico e Químico dos Feromônios de Trilha e de Marcação de Território de *Atta opaciceps Borgmeier* (1939) (Hymenoptera: Formicidae)**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 16 de março de 2012, às 09h00min, na Sala de Multimeios do Bloco 13 da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

*Ruth Rufino de Abreu Galdino*

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ruth Rufino de Abreu Galdino  
Orientadora - PPGQB/IQB/UFAL

*Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana*

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana  
PPGQB/IQB/UFAL

*Cyrolino Cabral Júnior*  
Prof. Dr. Cyrolino Cabral Júnior  
FANUT/UFAL

*Adriana de Lima Mendonça*  
Dr.<sup>a</sup>. Adriana de Lima Mendonça  
Pesquisadora PNPd/CAPES/RENORBIO

*Edson de Souza Bento*  
p/ Prof. Dr. Edson de Souza Bento  
PPGQB/IQB/UFAL

Dedico este trabalho ao Grande Arquiteto do Universo, Deus de amor e de bondade por todas as maravilhas concedidas a mim de formas indescritíveis em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Gerson Pinto de Campos e Jandira da Silva Campos (in memoriam) pelo germe da vida, pela dedicação de um imenso amor manifestado através do cuidado material, pela transmissão de valores éticos e morais, e muito mais pelo conhecimento e prática da palavra de Deus.

A minha esposa Rosiane de Almeida Campos, meus filhos Ezequias e Laís, pelo incentivo constante e as diversas e indescritíveis manifestações de amor.

A todos vós homens livres e de bons costumes que possuem o sonho de tornar mais feliz a humanidade pelo amor e pelo refinamento dos costumes e pelo exercício da tolerância.

## **AS INSTITUIÇÕES**

O presente trabalho contou com o apoio estrutural e financeiro da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento Rural – DIPAP da Secretaria de Estado da Agricultura e Desenvolvimento Agrário, pela lúcida e estratégica visão em propiciar a seus pesquisadores uma melhor preparação profissional.

Tributamos o nosso profundo agradecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

A Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ruth Rufino Do Nascimento (IQB-UFAL), pela orientação ministrada, como também pelas palavras de estímulo nos meus momentos de fragilidade, da maneira sabia de corrigir e da paciência inesgotável.

A Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana de Lima Mendonça (IQB-UFAL), pela amizade e ajuda dedicada durante todo o curso de doutorado, sempre disposta a ensinar e apoiar.

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant' Ana (IQB-UFAL), pelo apoio necessário em diversos momentos do curso de doutorado, sempre de forma cortes e amável.

Ao Prof. Dr. Cyro Rêgo Cabral Júnior (FANUT-UFAL), pela grande ajuda prestada na feitura deste trabalho mostrando sempre idéias novas, sugerindo e auxiliando nas análises estatísticas, além de que muitas vezes exceder em muito o seu precioso tempo de trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Ecologia Química Auridete Maria de Oliveira Correia, Fernando Lucas Torres de Mesquita, Ana Paula Pereira da Fonseca, José Joubert Gonçalves de Alencar, Carlos Eduardo da Silva, Maria do Rosário T. de Feitas, Diogo Ferro de Moura Sales, pelas muitas demonstrações de fraternidade e generosidade durante todo curso, responsáveis em tornar o ambiente de estudo e pesquisa não o fardo do trabalho, mas num ambiente de grande felicidade.

Ao colega e amigo Josival José Gomes de Almeida, pela demonstração de solidariedade em todos os momentos do curso de doutorado, facilitando e estimulando nos momentos mais conturbados de minha vida profissional.

Ao colega e amigo Prof. Dr. José Teodorico de Araújo Filho, diretor da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento Rural- DIPAP da Secretaria de Estado da Agricultura e Desenvolvimento Agrário do Estado de Alagoas, pelo irrestrito apoio para conclusão do curso.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia pelos ensinamentos transmitidos a minha pessoa durante o curso.

Aos colegas da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento Rural – DIPAP da Secretaria de Estado da Agricultura e Desenvolvimento Agrário, pelo estímulo e apoio logístico.

Aos amigos Péricles Gabriel Barros, Geraldo Malta e Eurico Eduardo Pinto de Lemos por nunca faltarem palavras de ânimo em todos os momentos de nossa convivência.

## RESUMO GERAL

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex* pertencem à ordem Himenóptera, família Formicidae, subfamília Myrmicinae e tribo Attini estão localizadas no continente americano, ocorrendo nas áreas tropicais do México e nas Américas Central e do Sul, são consideradas herbívoras e de difícil controle quando atacam as lavouras e florestas. As espécies *Atta texana* e *Acromyrmex versicolor* são as únicas representantes destas formigas encontradas na América do Norte. Várias espécies do Gênero *Atta* são encontradas no Brasil. Entender os comportamentos das formigas cortadeiras em sua múltipla divisão de trabalho constitui uma etapa necessária para estabelecer a convivência com estas, além de desenvolver e, ou adaptar novos métodos de controle, quando essas atingem o nível de dano econômico. Dessa forma, o presente estudo procurou esclarecer o comportamento de *Atta opaciceps* quanto à especificidade dos comportamentos de marcação de território e de trilha, verificando como as diversas castas respondem a diferentes extratos intra e interespecíficos (*Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *A. cephalotes*, *A. sexdens sexdens* e *A. sexdens rubropilosa*) sob condições de laboratório. Buscou-se também identificar os constituintes químicos presentes nos extratos de glândula de veneno de forrageiras de *A. opaciceps*, objetivando saber quais os compostos responsáveis pelo eliciamento do comportamento de trilha em forrageiras desta espécie.

**Palavras-chaves:** Feromônio de trilha. Feromônio de marcação de território. Formigas cortadeiras. *Atta opaciceps* reconhecimento intra e interespecífico.

## GENERAL ABSTRACT

The leaf-cutting ants of the genus *Atta* and *Acromyrmex* belong to the order Hymenoptera, Formicidae family, Myrmicinae subfamily and Attini tribe are located in the Americas, occurring in tropical areas of Mexico and in Central and South America, are considered herbivorous and difficult to control when attacking crops and forests. The species *Atta texana* and *Acromyrmex versicolor* are the only representatives of these ants found in North America. Several species of the genus *Atta* are found in Brazil. Understanding the behavior of leaf-cutting ants in their multiple division of labor is a necessary step to establish living with them, and develop or adapt new methods of control, when they reach the economic injury level. Therefore, this study sought to clarify the behavior of *Atta opaciceps* regarding the specificity of behaviors of territory marking and trail, seeing how the different castes respond to different intra- and interspecific extracts (*Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *A. cephalotes*, *A. sexdens sexdens* and *A. sexdens rubropilosa*) on laboratory conditions. It also sought to identify the chemical constituents present in the foragers venom gland extracts of *A. opaciceps*, seeking to know what the compounds responsible for eliciting the trail behavior of foragers of this species.

**Keywords:** Trail pheromone. Territory marking pheromone. Leaf-cutting ants. *Atta opaciceps*. Interspecific recognition.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 – Localização de algumas glândulas exócrinas de uma formiga do gênero *Atta*..... 30

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 – Metodologia empregada na preparação de extratos de feromônio de trilha de *Atta opaciceps*, onde: A = extração da glândula de veneno; B = transferência da glândula para o macerador; C = adição de hexano; D = maceração; E = transferência para ampola de 2 mL, sendo selada e acondicionada em freezer ..... 50
- Figura 2 – Arena de bioensaios, onde: A: antecâmara, B: câmara principal, C: disco de papel e D: porta deslizante. .... 51
- Figura 3A – (I) Cromatograma representativo do extrato da glândula de veneno de forrageira de *Atta opaciceps*, apresentando 1= 2,5-dimetilpirazina (DMP) e 3= 3-etil-2,5-dimetilpirazina (EDMP).  
(II) Fragmentograma característico para o composto 1 (Figura 4A)..... 56
- Figura 3B – Fragmentograma da 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (M4MPC, Figura 4B) (modo SIM=m/z 139) para a espécie *A. opaciceps*..... 57
- Figura 3C – Fragmentograma da 3-etil-2,5-dimetil-pirazina (EDMP, Figura 4C) (modo SIM=m/z 136) para a espécie *A. opaciceps*..... 57
- Figura 4 – N Espectros de massa dos compostos pelo método de varredura SIM, onde cada letra corresponde a: A: 2,5-dimetilpirazina (DMP); B: 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (M4MPC) e C: 3-etil-2,5-dimetilpirazina (EDMP)..... 57

Figura 5 – Cromatograma total de íons obtido pela técnica de varredura SCAN para o extrato da glândula de veneno de <i>Atta opaciceps</i> (linha rosa corresponde à corrida do branco). O pico de maior abundância no cromatograma corresponde ao contaminante ftalato. ....	59
--	----

### CAPÍTULO 3

Figura 1 – Discos de papel de filtro.....	73
---	----

Figura 2 – Arena de vidro.....	74
--------------------------------	----

Figura 3 – Comportamento de toque entre duas formigas da espécie <i>A. opaciceps</i> da casta forrageira durante o bioensaio no laboratório. ....	75
---	----

Figura 4 – Marcação da fonte de odor (papel de filtro impregnado com extrato) inclinação de abdômen e com a extremidade final do gáster de uma formiga da espécie <i>A. opaciceps</i> da casta forrageira durante bioensaio.....	75
--	----

Figura 5 – Desenho esquemático da formiga da espécie <i>Oecophylla longinodato</i> tocando o terminal do gáster sobre a superfície.....	76
---	----

## LISTA DE TABELA

### CAPITULO 2

- Tabela 1 – Íons característicos das substâncias escaneadas e monitoradas empregando a técnica de varredura SIM em extratos das glândulas de veneno de *Atta opaciceps*..... 53
- Tabela 2 – Resposta das quatro castas de *Atta opaciceps* diante do extrato das glândulas de veneno de formigas da casta forrageira..... 54
- Tabela 3 – Resposta das formigas casta forrageira de *Atta opaciceps* submetidas extratos de glândulas de veneno de castas coespecíficas..... 54
- Tabela 4 – Respostas das formigas casta forrageira da espécie *Atta opaciceps* submetidas extratos de glândulas de veneno de diferentes espécies de formigas cortadeiras..... 55

### CAPITULO 3

- Tabela 1 – Respostas médias de marcação de território (comportamento de Toque entre si) de forrageiras de *Atta opaciceps* para diferentes castas, ao tratamento controle (hexano) e a testemunha (branco)..... 79
- Tabela 2 – Respostas médias de marcação de território (comportamento de toque na fonte de odor) de forrageiras de *Atta opaciceps* para diferentes castas, ao tratamento controle (hexano) e a testemunha (branco)..... 80
- Tabela 3 – Valores de marcação de território (comportamento de toque entre si) de formigas de *Atta opaciceps* de diferentes castas (casta 1: Jardineiras, casta 2: generalistas, casta 3: forrageiras, casta 4: soldados) submetidas ao extrato de forrageiras (tratamento 1), ao hexano (tratamento 2-controle) e ao disco limpo (tratamento 3-testemunha)..... 81

Tabela 4 - Valores de marcação de território (comportamento de toque na fonte) de formigas de <i>Atta opaciceps</i> de diferentes castas (casta 1: Jardineiras, casta 2: generalistas, casta 3: forrageiras, casta 4: soldados) submetidas ao extrato de forrageiras (tratamento 1), ao hexano (tratamento 2-controle) e ao disco limpo (tratamento 3-testemunha).....	82
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Percentagem

µL - microlitro

CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

cm - centímetros

D.P - Desvio Padrão

EI - Impacto eletrônico

eV - Eletron-volts

HPLC - High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

HSD - Honestly Significant Difference (Diferença honestamente significativa)

IE - Inseto equivalente

KDa - Quilodalton

Kg - Quilograma

m/z - razão massa/carga

mL - mililitro

mm - milímetros

NAP - Número de arcos percorridos

ng - nanogramas

Ø - diâmetro

P.A - para análise

pg-picogramas

SIM – Selected ion monitoring (monitoramento seletivo de íons)

W - Watts

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	17
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	20
	<b>CAPITULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
<b>1.1</b>	<b>Os Sinais Químicos Envolvidos na Comunicação Entre Organismos</b> ....	24
<b>1.2</b>	<b>A comunicação entre as formigas cortadeiras</b> .....	24
1.2.1	Os Feromônios de Alarme.....	24
1.2.2	Os Feromônios de Funeral.....	26
1.2.3	Os Feromônios de Trilha.....	26
1.2.4	Os Feromônios de Marcação de Território.....	28
<b>1.3</b>	<b>As Glândulas Exócrinas de Formigas Cortadeiras</b> .....	29
1.3.1	As Glândulas Mandibulares.....	30
1.3.2	A Glândula de Dufour.....	32
1.3.3	A Glândula de Veneno.....	33
1.3.4	As Glândulas Metapleurais.....	34
<b>1.4</b>	<b>Extração, Atividade Biológica e Identificação dos Feromônios de Insetos</b>	34
	<b>REFERÊNCIAS</b>	38
	<b>CAPITULO 2 - POLIETISMO E RECONHECIMENTO INTRA E INTER-ESPECÍFICO DO FEROMÔNIO DE TRILHA DE <i>Atta opaciceps</i></b> .....	42
	<b>RESUMO</b> .....	43
	<b>ABSTRACT</b> .....	44
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	45
<b>2.1</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	47
<b>2.2</b>	<b>Material e Métodos</b> .....	48
2.2.1	Coleta de Insetos.....	48

2.2.2	Identificação da Espécie.....	49
2.2.3	Preparação dos Extratos.....	49
2.2.4	Bioensaios sob Condições de Laboratório.....	50
2.2.5	Delineamento Experimental e Análises Estatísticas.....	51
2.2.6	Análises Químicas dos Extratos.....	52
<b>2.3</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>53</b>
2.3.1	Avaliação do Comportamento Intra-Específico de Trilha de <i>A. opaciceps</i> .....	53
2.3.2	Avaliação da Resposta de Forrageiras de <i>A. opaciceps</i> Diante de Extratos Inter-Específicos de <i>A. sexdens sexdens</i> , <i>A. sexdens rubropilosa</i> , <i>A. cephalotes</i> e <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> .....	55
2.3.3	Análises Químicas dos Extratos Hexânicos de Glândulas de Veneno de <i>A. opaciceps</i> .....	56
<b>2.4</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>59</b>
<b>2.5</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
	<b>CAPITULO 3 - POLIETISMO E RECONHECIMENTO INTRA-ESPECÍFICO DO FEROMÔNIO DE MARCAÇÃO DE TERRITÓRIO DE <i>Atta opaciceps</i>.....</b>	<b>66</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>67</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>68</b>
<b>3.1</b>	<b>Importância das Formigas Cortadeiras.....</b>	<b>69</b>
<b>3.2</b>	<b>Polietismo e a Divisão Social do Trabalho.....</b>	<b>69</b>
<b>3.3</b>	<b>Feromônio de Marcação de Território.....</b>	<b>69</b>
	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>71</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1</b>	<b>Coleta de Insetos.....</b>	<b>72</b>
<b>4.2</b>	<b>Identificação da Espécie.....</b>	<b>72</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparação dos Extratos.....</b>	<b>72</b>
<b>4.4</b>	<b>Preparação dos Discos de Papel de Filtro.....</b>	<b>73</b>

4.5	Bioensaios.....	73
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	77
6	RESULTADOS.....	78
6.1	Descrição do Comportamento de Marcação de Território de <i>A. opaciceps</i> .....	78
6.2	Avaliação do Comportamento de Marcação de Território de Forrageiras de <i>A. opaciceps</i> .....	78
6.3	Avaliação do Comportamento de Marcação de Território de Diferentes Castas de <i>A. opaciceps</i> .....	80
7	DISCUSSÃO.....	83
8	CONCLUSÕES.....	85
9	CONCLUSÃO GERAL.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As formigas cortadeiras são insetos pertencentes à ordem Hymenoptera, família Formicidae, subfamília Myrmicinae e tribo Attini (GALLO et al., 2002), cuja distribuição geográfica está limitada ao continente americano, ocorrendo nas áreas tropicais do México e nas Américas Central e do Sul. As espécies *Atta texana* e *Acromyrmex versicolor* são as únicas representantes destas formigas encontradas na América do Norte (GUÉNARD et al., 2010).

Dentre os países da América Latina, o Brasil é o que possui o maior número de espécies de formigas cortadeiras, compreendendo vinte espécies e nove subespécies do gênero *Acromyrmex*, dez espécies e três subespécies do gênero *Atta* (DELLA LUCIA; FOWLER, 1993; FORTI; BOARETTO, 1997).

Devido ao hábito de selecionarem e cortarem grande quantidade de vegetação fresca para servir de substrato para o fungo (*Leucoagaricus gongylophorus*, (Möller) Singer, Agaricales: Agaricaceae), que cultivam, as formigas dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* são conhecidas como formigas cortadeiras e são consideradas pragas severas da agrossilvicultura e das pastagens (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; SILVA-PINHATI et al., 2004). Dependendo do tipo de vegetação selecionada para o corte, estas formigas podem ser classificadas em duas categorias: as que cortam exclusivamente gramíneas e as que cortam uma ampla variedade de vegetação (FOWLER et al., 1989).

Embora os danos causados pelas formigas cortadeiras sejam facilmente detectados e visualizados, estes insetos constituem uma parte essencial dos ecossistemas nos quais se encontram inseridos visto que, executam a poda e estimulam o crescimento de plantas, revolvendo e enriquecendo o solo (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Entretanto, é imprescindível que populações destes insetos sejam mantidas em um nível de controle para que, deste modo, os danos causados por eles sejam minimizados.

Métodos químicos para controle de formigas cortadeiras são os mais frequentemente utilizados, sendo o produto químico tóxico aplicado diretamente nos ninhos, nas formulações sob a forma de pó, líquidos ou líquidos nebulizáveis, ou

apresentado na forma de iscas granuladas, aplicadas nas proximidades das colônias (BOARETTO; FORTI, 1997). Considerada um dos métodos mais eficientes, as iscas granuladas são compostas por mistura de polpa cítrica desidratada (veículo) e ingrediente ativo dissolvido em óleo de soja, com formulação em pellets (ROBINSON, 1979; FORTI et al., 1998). O substrato atrativo efetivo amplamente utilizado é a polpa cítrica desidratada, particularmente aquela derivada de laranja, apresentando-se levemente ácida, alto conteúdo de carboidrato, contendo ainda nitrogênio e grande variedade de vitaminas e microelementos (BOARETTO; FORTI, 1997). As iscas granuladas são carregadas pelas operárias para dentro do ninho, onde as substâncias tóxicas seriam absorvidas pelo fungo cultivado e posteriormente pelas formigas, através da ingestão do alimento produzido pelo fungo, levando-as a morte (JAFFÉ, 1993).

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* apresentam castas permanentes e temporárias. Estas últimas são constituídas por centenas ou milhares de fêmeas e machos alados que ocorrem apenas quando a colônia está suficientemente madura e em determinados períodos do ano, exclusivamente para reprodução. Quanto às castas permanentes, estas abrangem fêmeas ápteras, sendo uma fundadora (rainha) e inúmeras operárias estéreis (DELLA LUCIA; FOWLER; ARAÚJO, 1993). As operárias, no entanto, apresentam um acentuado polimorfismo e executam diferentes atividades dentro e fora do ninho. Considerando estas características e a largura diferenciada da cápsula cefálica exibidas pelas operárias, Wilson (1980) dividiu-as em quatro castas: jardineiras, generalistas, forrageiras e soldados. Essa variação distinta de tamanho torna o sistema de comunicação de formigas cortadeiras bastante complexo. O mesmo é regulado principalmente por substâncias químicas presentes nas secreções de suas glândulas exócrinas; denominados feromônios que atuam, modificando, o comportamento das formigas e são empregados na manutenção da organização social de suas colônias. (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

O emprego de feromônios, tais como, de alarme e de trilha de formigas cortadeiras, que atuam mediando interações intra e interespecíficas, tem sido bem documentado e, para algumas espécies dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*, tais feromônios foram identificados (BUTENANDT; LINZEN; LINDAUER, 1959; BLUM,

1968; MOSER; BROWNLEE; SILVERSTEIN, 1968; TUMLINSON et al., 1971; RILEY et al., 1974; CROSS et al., 1979, 1982; EVERSLED; MORGAN, 1983; DO NASCIMENTO et al., 1993, 1994; HERNANDEZ; CABRERA; JAFFE, 1999; HUGHES; HOWSE; GOULSON, 2001; FRANCELINO et al., 2008). Quanto ao feromônio de marcação de território, o relato restringe-se a uma única espécie de *Atta*, *Atta laevigata* (SALZEMANN; JAFFÉ, 1990; SALZEMANN et al., 1992).

Enormes quantidades de agrotóxicos são aplicadas na tentativa de controle das formigas cortadeiras e, nem sempre apresentam resultados satisfatórios (DELLA LUCIA; FOWLER, 1993). Existe uma grande necessidade de buscar novas formas de controle que levem a redução do volume aplicado e os seus efeitos residuais. Portanto é necessário que se invista em métodos mais eficazes e menos dispendiosos e principalmente, biologicamente corretos, a fim de se obter um controle mais efetivo desses insetos. Trabalhos vêm sendo desenvolvidos através do estudo vários mecanismos de utilização de feromônios de modo a controlar o ataque destas formigas às plantações. Uma delas é a utilização do feromônio de trilha com iscas comerciais possibilitando uma maior atração ou dispersão, aumentando a eficiência do método (FOWLER et al., 1989; SUCKLING; STRINGER; CORN, 2011). Nesse sentido ressalta-se, portanto, a condução de pesquisas sobre feromonios das formigas cortadeiras, buscando desvendar sua composição química, como também o comportamento dessas diante dos mesmos.

Assim, no presente estudo, foram investigados os comportamentos de trilha e de marcação de território da espécie *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939, o qual está dividido em três capítulos, da seguinte forma: 1) Revisão de Literatura; 2) Polietismo e reconhecimento intra-e-interespecífico do feromônio de trilha de *Atta opaciceps*; 3) Polietismo e reconhecimento intra-específico do feromônio de marcação de território de *Atta opaciceps*.

## REFERÊNCIAS

BLUM, M. S. Alarm pheromones. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 14, p. 157-180, 1968. ISSN 0066-4170.

BOARETTO, M. A. C; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 11, n. 30, p. 1-46, 1997. ISSN 0100-8137.

BUTENANDT, A.; LINZEN, B.; LINDAUER, M. Über einen eschlechtsspezifischen duftstoff der mandibeldrüse der blatscheiderameise *atta sexdens rubropilosa* forel. **Archives d' Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale**, Paris, v. 48, p. 13-19, 1959. ISSN 0003-9594.

CROSS, J. H. et al. The major component of the trail pheromone of the leaf cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel: 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine. **Journal of Chemical Ecology**, New York, p. 187-204, 1979. ISSN 0098-03315.

\_\_\_\_\_. et al. Trail pheromone of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae: Myrmicinae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 8, p. 1119-1124, 1982. ISSN 0098-03315.

DELLA LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G. As formigas cortadeiras. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa, MG: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1993. p. 1-2.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Araújo, M. S. Castas de formigas cortadeiras. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa, MG: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1993. p. 45-53.

DO NASCIMENTO, R. R. et al. Trail pheromone of leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Forel). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 1719-1724, 1994. ISSN 0098-03315.

\_\_\_\_\_. et al. Variation with the caste of the mandibular gland secretion in the leafcutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, p. 907-918, 1993. ISSN 0098-03315.

EVERSHED, R. P.; MORGAN, E. D. The amounts of trail pheromone substance in the venom of worker of four species of Attine ants. **Insect Biochemistry**, Bristol, v. 3, n. 5, p.469-479. ISSN 0020-1790.

FORTI, L. C.; BOARETTO, M. A. C. **Formigas cortadeiras: biologia, ecologia, danos e controle**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1997.

FOWLER, H.G. et al.. A pest is a pest is a pest? the dilemma of neotropical leaf-cutting ants: keystone taxa of natural ecosystems. **Environmental Management**. New York. v. 13, p. 671-675, 1989. ISSN 0364-152X.

FRANCELINO, M. R. V. et al. Polyethism and nestmate recognition in the alarm reaction of *Atta* leaf-cutting ants. **Physiological Entomology**, London, v. 33, p. 37-42, Mar. 2008. ISSN 0307-6962.

GALLO, D. et al. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2002.

GUÉNARD, B.; WEISER, M. D.; DUNN, R. R. **Ant genera of the world**. 2010. Disponível em: <[http://www.antmacroecology.org/ant\\_genera/index.html](http://www.antmacroecology.org/ant_genera/index.html)>. Acesso em: 1 jul. 2011.

HERNÁNDEZ, J. V.; CABRERA, A.; JAFFE, K. Mandibular gland secretion in different castes of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 25, n. 2, p. 2433-2444, 1999. ISSN 0098-03315.

HÖLDOBLER, B.; WILSON, E. **The ants**. Cambridge: Belknap; Harvard University Press, 1990.

HUGHES, W. O. H.; HOWSE, P. E.; GOULSON, D. Mandibular gland chemistry of grass-cutting ants: species, caste and colony variation. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 27, n. 2, p. 109-124, 2001. ISSN 0098-03315.

JAFFE, K. **El mundo de las hormigas**. Baruta: Equinócio:Universidade Simon Bolívar, 1993.

MOSER, J. C.; BROWNLEE, R. C.; SILVERSTEIN, R. Alarm pheromones of the ant *Atta texana*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 14, p. 529-535, 1968. ISSN 0022-1910.

RILEY, R. G. et al. Methyl 4-methylpyrrole-2-carboxylate, a volatile trail pheromone from the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 20, p. 651-654. 1974. ISSN 0022-1910.

ROBINSON, S. W. Leaf-cutting ant control schemes in Paraguay, 1961-1977: some failures and some lessons. **Pans: Pest Articles and News Summaries**, v. 25, p. 386-390, 1979.

SALZEMANN, A.; JAFFE, K. Territorial ecology of the leaf-cutting ant, *Atta laevigata* (Fr. Smith) Hymenoptera: Myrmicinae. In: VANDER MEER, R. K.; JAFFE, K.; CEDEÑO, A. (Ed.). **Applied myrmecology: a world perspective**. Boulder: Westview Press, 1990. p. 345-354.

SALZEMANN, A. et al. Leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Formicidae: Attini) marks its territory with colony specific dufour gland secretion. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 18, n. 2, p. 183-196, 1992. ISSN 0098-03315.

SILVA-PINHATI, A. C. O. et al. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Ribeirão Preto, v. 37, p.1463-147, 2004. ISSN 0100-879X.

SUCKLING, D. M.; STRINGER, L. D.; CORN, J. E. Argentine ant trail pheromone disruption is mediated by trail concentration. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 37, p. 1143-1149, 2011. ISSN 0098-03315.

TUMLINSON, J. H. et al. Identification of the trail pheromone of a leaf-cutting ant *Atta texana*. **Nature**, London, v. 234, p. 348-349, 1971. ISSN 0028-0836.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae: Atta): the overall pattern in *Atta sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 7, p. 143-156, 1980.



## **1.1 Os Sinais Químicos Envolvidos na Comunicação entre Organismos**

Os organismos fazem uso de sinais para transmitirem informações e, dependendo do modo de ação de cada sinal, estes são classificados em quatro tipos: visuais, auditivos, tácteis e químicos. Ocasionalmente, a combinação de dois, três ou até mesmo dos quatro tipos de sinais, pode ser empregada por um determinado organismo; entretanto, a predominância de um tipo de sinal altera a importância dos demais quando os mesmos são empregados simultaneamente (DO NASCIMENTO, 1994).

Os insetos, em particular, utilizam os sinais químicos para transmitir informações entre si, os quais podem atuar entre indivíduos de mesma ou de diferentes espécies. Estes sinais são denominados de semioquímicos e estão classificados em: aleloquímicos (mediam interações interespecíficas) e feromônios (atuam em interações intraespecíficas) (VILELA; DELLA LUCIA, 2001).

Os feromônios são classificados de acordo com as respostas que evocam no organismo receptor do sinal químico; se a resposta estiver relacionada a mudanças fisiológicas provocadas no receptor do sinal, este último é denominado de feromônio de efeito preparador. Entretanto, se a recepção do sinal estiver relacionada a mudanças comportamentais provocadas no receptor, o sinal é denominado de feromônio de efeito desencadeador (WILSON; BOSSERT, 1963).

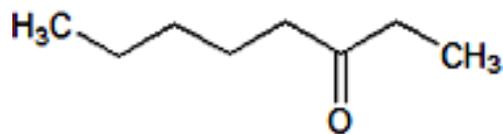
## **1.2 A Comunicação entre as Formigas Cortadeiras**

A existência de feromônio de efeito preparador ainda não foi comprovada em formigas cortadeiras. Os feromônios desencadeadores, entretanto, são responsáveis por grande parte do comportamento exibido por estas formigas e atuam, regulando a organização social das colônias. Eles são classificados de acordo com o comportamento que desencadeiam em: feromônio de alarme, de funeral, trilha e recrutamento e de marcação de território (DO NASCIMENTO; SANT'ANA, 2001).

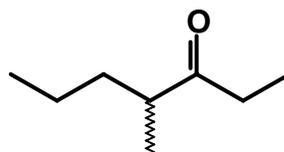
### **1.2.1 Os Feromônios de Alarme**

Os feromônios de alarme são amplamente utilizados por insetos sociais para sinalizar uma situação de perigo e recrutar indivíduos do mesmo ninho para a defesa do mesmo. Estes feromônios são constituídos por substâncias voláteis, apresentando entre cinco a doze átomos de carbono na cadeia e peso molecular variando entre 100 a 200 unidades de massa (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; FRANCELINO et al., 2008).

Compostos oxigenados, mais especificamente, cetonas de cadeia linear e ramificada, contendo oito átomos de carbono, foram identificados como componentes do feromônios de alarme de espécies de formigas cortadeiras. Em duas espécies do gênero *Acromyrmex*, *A. versicolor* e *A. octospinosus*, a substância 3-octanona [1] é o principal componente do feromônio de alarme (CREWE; BLUM, 1972), enquanto é o composto secundário em *Atta cephalotes* (RILEY et al., 1974a). Por sua vez, o composto 4-metil-3-heptanona [2] foi identificado como o feromônio de alarme de oito espécies do gênero *Atta*, *A. texana*, *A. robusta*, *A. bisphaerica*, *A. s. rubropilosa*, *A. laevigata*, *A. capiguara*, *A. s. sexdens* e *A. opaciceps* (MOSER; BROWNLEE, 1968; BLUM, 1968; RILEY et al., 1974a; DO NASCIMENTO et al., 1993.; DO NASCIMENTO, 1994; HERNANDEZ; CABRERA; JAFFE, 1999; HUGHES; GOULSON, 2001a, 2001b; FRANCELINO et al., 2006, 2008).



[1]



[2]

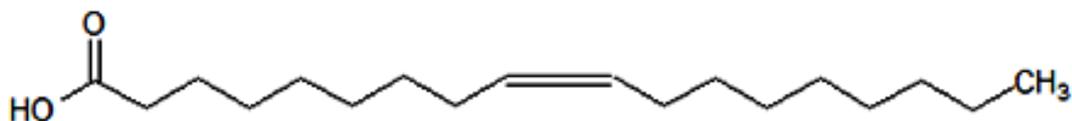
Outros estudos demonstraram que a proporção de 4-metil-3-heptanona é inversamente proporcional ao tamanho da operária de cinco das espécies de *Atta*

cujo feromônio de alarme foi identificado (DO NASCIMENTO et al., 1993; HERNANDEZ et al., 1999; HUGHES; GOULSON, 2001a; FRANCELINO et al., 2008) Hughes et al. (2001 b) e Francelino et al. (2006) também demonstraram que, esta cetona está envolvida no reconhecimento intraespecífico entre indivíduos pertencentes a diferentes colônias de *A. capiguara*, *A. bisphaerica* e *A. s. sexdens*.

### 1.2.2 Os Feromônios de Funeral

São substâncias químicas liberadas por indivíduos mortos, as quais eliciam em indivíduos vivos o comportamento de necroforese (remoção de co-específicos mortos). Em formigas cortadeiras do gênero *Atta*, por exemplo, foi observado o comportamento de deposição de indivíduos mortos em câmaras especiais (MOSER et al., 1968). Até o presente momento, a natureza química das substâncias envolvidas neste tipo de comportamento em formigas cortadeiras ainda não foi elucidada, entretanto, acredita-se que, tais substâncias sejam ácidos graxos e derivados da degradação enzimática dos mesmos.

O ácido oléico [3], por exemplo, foi identificado como o composto responsável pelo comportamento de necroforese em espécies de formigas *Pogonomyrmex badius* e *Solenopsis invicta*, as quais pertencem a mesma subfamília que as formigas cortadeiras. Formigas vivas destas espécies, quando contaminadas com ácido oléico são tratadas como mortas (WILSON; DURIACH; ROTH, 1958).



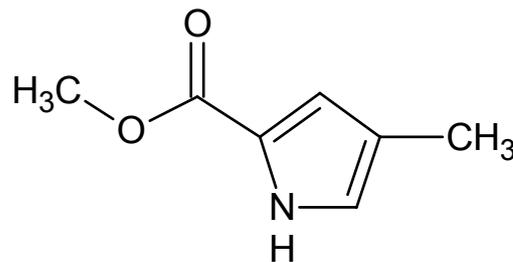
[3]

### 1.2.3 Os Feromônios de Trilha

O feromônio de trilha é uma mistura de substâncias depositada sobre uma superfície por um indivíduo e detectada por outros indivíduos da mesma espécie

(ALI; MORGAN, 1990). Quando uma operária forrageira encontra uma fonte de alimento, ela retorna ao ninho, impregnando a superfície por onde caminha, com um odor típico da espécie, que orienta as companheiras até essa fonte, as quais retornam ao ninho transportando o alimento, e reforçando as marcas químicas na trilha. Assim que se esgota o alimento, as últimas operárias que retornam ao ninho não mais reforçam a trilha, levando-a a desaparecer em um espaço de tempo superior a 48 horas (DO NASCIMENTO; SANT'ANA, 2001). Conforme Moreira (1992), a atividade de uma trilha artificial contendo o feromônio de trilha da subespécie *Acromyrmex subterraneus subterraneus* é de 96 horas.

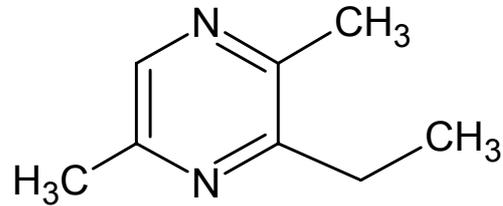
Tumlinson et al. (1971, 1972) reportou a identificação do primeiro feromônio de trilha de uma espécie de *Atta*, *A. texana* como sendo o composto 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (M4MPC) [4]. Estudos subseqüentes demonstraram que esta mesma substância, em diferentes concentrações, constitui o feromônio de trilha de *A. cephalotes*, *A. laevigata* e *A. robusta* (RILEY et al., 1974a; RILEY; SILVERSTEIN; MOSER, 1974b; OLIVEIRA, 1975; OLIVEIRA et al., 1990) e de *Acromyrmex octospinosus* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (CROSS, WEST; SILVERSTEIN, 1982; DO NASCIMENTO et al., 1994).



[4]

Uma substância diferente, a 3-etil-2,5-dimetilpirazina (EDMP) [5] foi identificada como o feromônio de trilha de *A. sexdens rubropilosa* (CROSS et al., 1979) e a mistura M4MPC e EDMP foi caracterizada como sendo o feromônio de trilha de *A. sexdens sexdens* e *Acromyrmex subterraneus molestans* (MARTINEZ,

1988; EVERSLED; MORGAN, 1983; CROSS et al., 1992), sendo que a proporção entre os dois componentes para *A. sexdens sexdens* é de 14:1.



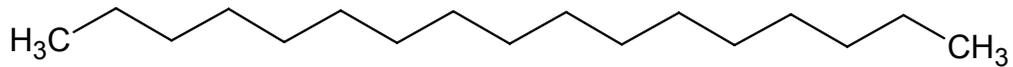
[5]

A composição química do feromônio de trilha de *A. sexdens rubropilosa* também foi re-examinada por Do Nascimento (1994), vinte e cinco anos após o primeiro relato da identificação do feromônio desta espécie. Neste estudo, empregando-se técnicas modernas de identificação de substâncias voláteis, constatou-se que EDMP é o único componente do feromônio desta espécie e que a quantidade desta substância, presente na glândula de veneno de operárias, tende a aumentar à medida que o tamanho da operária aumenta. Embora, o resultado esperado fosse exatamente o oposto, visto que as operárias maiores não estão diretamente envolvidas em atividades relacionadas ao recrutamento de coespecíficos para o comportamento de trilha.

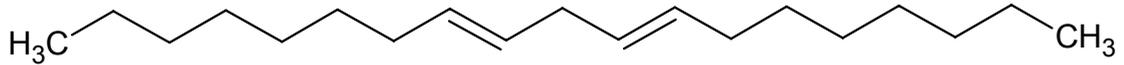
#### 1.2.4 Os Feromônios de Marcação de Território

Os feromônios de território são compostos usados por formigas, os quais apresentam três funções distintas: marcar uma área específica em que a colônia escolheu para se estabelecer, indicar a entrada do ninho e diferenciar ninhos de colônias diferentes (DO NASCIMENTO et al., 1996).

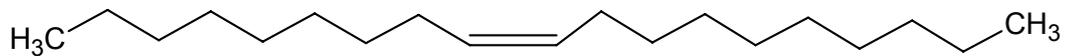
Salzemann e Jaffé (1990) demonstraram que operárias de *A. laevigata* marcam o seu território e a entrada do ninho com um feromônio que é depositado em uma superfície através do ferrão. Quatro hidrocarbonetos de cadeia linear: heptadecano [6], 8,11-nonadecadieno [7], (Z)-9-nonadeceno [8] e (Z)-9-tricoseno [9] foram identificados como os componentes do feromônio de marcação de território de operárias de *Atta laevigata* (SALZEMAN et al., 1992). A estereoquímica da ligação dupla nos dois últimos compostos foi determinada, entretanto, para o segundo composto, a mesma não foi mencionada pelos autores.



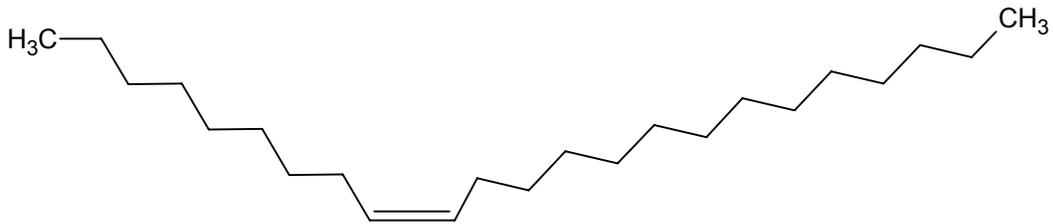
[6]



[7]



[8]

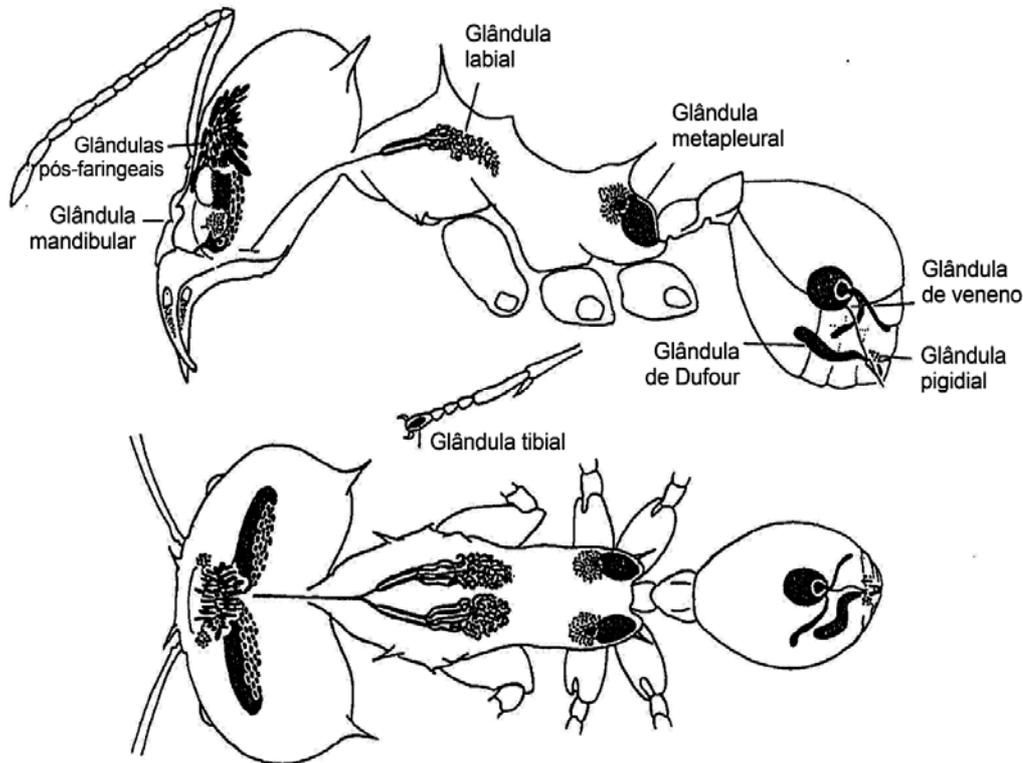


[9]

### 1.3 As Glândulas Exócrinas de Formigas Cortadeiras

As formigas cortadeiras possuem no interior do seu corpo uma série de glândulas exócrinas (Figura 1), as quais produzem uma gama de produtos naturais que estão envolvidos na comunicação intraespecífica, dentre eles alcóois, cetonas, hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos, aldeídos e terpenos (DO NASCIMENTO; SANT'ANA, 2001).

**Figura 1 – Localização de algumas glândulas exócrinas de uma formiga do gênero *Atta***



Fonte: Do Nascimento, 1994.

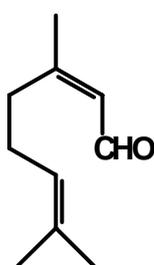
### 1.3.1 As Glândulas Mandibulares

Localizada na cabeça e conectada às mandíbulas localiza-se um par de glândulas, as quais, em formigas cortadeiras, são responsáveis pela produção e armazenamento do feromônio de alarme (MOSER; BROWNLEE; SILVESTEIN, 1968; BLUM; HERMANN, 1969; RILEY; SILVERSTEIN; MOSER, 1974b; DO NASCIMENTO et al.; 1993; HERNANDEZ; CABRERA; JAFFE, 1999; HUGHES; HOWSE; GOULSON, 2001a; HUGHES; GOULSON, 2001b; FRANCELENO et al., 2008).

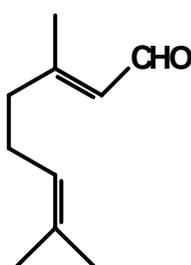
Numerosos estudos têm examinado a química da secreção da glândula mandibular. Nos primeiros trabalhos, Butenandt, Linzen e Lindauer (1959) identificaram o citral (mistura dos isômeros neral [10] e geranial [11]) como o

principal componente de *Atta sexdens rubropilosa*. Posteriormente, Moser, Brownlee e Silverstein (1968) encontraram 4-metil-3-heptanona [12] e 2-heptanona [13] na proporção de 4:1 como os principais componentes de operárias maiores de *Atta texana*. Estas cetonas foram também identificadas no feromônio de alarme de seis outras espécies de *Atta*: *A. bisphaerica*, *A. capiguara*, *A. colombica*, *A. laevigata*, *A. robusta* e *A. sexdens* (BLUM, 1968). Entretanto, em pesquisas subseqüentes, Do Nascimento et al. (1993) revelaram que a química da secreção da glândula mandibular é muito mais complexa do que os estudos anteriores sugeriram e cerca de 56 compostos foram identificados.

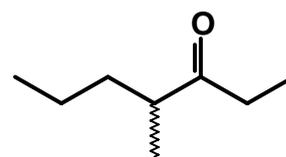
Trabalhos recentes revelaram que em espécies de *Atta laevigata*, *Atta capiguara*, *Atta opaciceps*, *Atta sexdens sexdens* e *Atta bisphaerica* a 4-metil-3-heptanona é o composto comum encontrado nestas espécies com maiores proporções principalmente nas operárias menores, seguido por outras cetonas e monoterpenos tais como citral,  $\beta$ -citronelol [14] e geraniol [15], (HERNANDEZ; CABRERA; JAFFE, 1999, HUGUES; HOWSE; GOULSON, 2001; FRANCELINO et al., 2006).



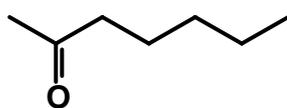
[10]



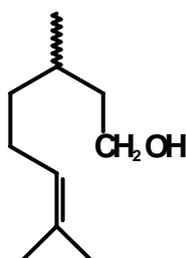
[11]



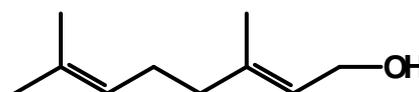
[12]



[13]



[14]



[15]

### 1.3.2 A Glândula de Dufour

No abdômen estão localizadas as glândulas de Dufour e de veneno e ambas estão conectadas ao ferrão da maioria das formigas, inclusive nas cortadeiras, embora no caso específico destas formigas, o ferrão seja utilizado especificamente para a deposição das secreções destas glândulas no substrato apropriado, ou seja, no solo durante o recrutamento das operárias para as trilhas; nas imediações do ninho para delimitar o território em que uma colônia resolveu se estabelecer. (DO NASCIMENTO; SANT'ANA, 2001).

A secreção da glândula de Dufour de formigas em geral é constituída por uma mistura de hidrocarbonetos saturados e insaturados de cadeia linear apresentando número ímpar de átomos de carbono variando entre C<sub>9</sub> a C<sub>27</sub>. Entretanto, compostos oxigenados, tais como: alcoóis, aldeídos, cetonas e ésteres e, hidrocarbonetos de cadeia linear e ramificada também podem ser encontrados na secreção, em menor proporção (KEEGANS et al., 1993).

A composição química da secreção da glândula de Dufour de quatro espécies de *Atta*, *A. cephalotes*, *A. sexdens sexdens*, *A. sexdens rubropilosa* e *A. laevigata* e de uma espécie de *Acromyrmex*, *Acromyrmex octospinosus* foi investigada por diversos autores (EVERSHED; MORGAN, 1980, 1981; SALZEMANN; JAFFÉ, 1990; DO NASCIMENTO et al., 1993). Dentre eles, Evershed e Morgan (1980, 1981) identificaram dois componentes: n-tetradecano e homofarneseno na secreção de operárias de *Acromyrmex octospinosus*, entretanto na secreção da glândula de *Atta cephalotes* foram encontrados quatorze compostos, na sua grande maioria hidrocarbonetos de cadeia linear, saturados e insaturados, contendo entre 12 a 19 átomos de carbono, sendo que dentre estes, o composto 9-heptadeceno [16] é o componente majoritário.



[16]

As secreções das glândulas de Dufour de *A. sexdens sexdens* e *A. sexdens rubropilosa* consistem em uma mistura de alcanos e alcenos com 15 a 23 átomos de carbono e, embora qualitativamente a mistura seja idêntica, as proporções relativas dos componentes individuais diferem significativamente nas duas subespécies. Em *A. sexdens sexdens*, o alceno (Z)-9-tricoseno é o componente principal enquanto que na secreção de operárias de *A. sexdens rubropilosa*, o composto (Z)-9-nonadeceno predomina (EVERSHED; MORGAN, 1981).

Conforme Salzemann et al. (1992), a secreção da glândula de Dufour de *Atta laevigata* é responsável pelo eliciamento do comportamento de marcação de território em operárias desta espécie. Quatro compostos: heptadecano, 8,11-nonadecadieno, (Z)-9-nonadeceno e (Z)-9-tricoseno foram identificados como os componentes do feromônio de marcação de território, sendo este o único relato que atribuiu a função de marcação de território para alguns componentes da glândula de Dufour registrado na literatura.

### 1.3.3 A Glândula de Veneno

Para os insetos sociais, a glândula de veneno é responsável pela produção de substâncias tóxicas, empregadas na defesa (BLUM; HERMANN, 1969). Ela constitui a principal fonte de feromônio de trilha em formigas cortadeiras, o qual é encontrado nesta glândula em quantidades extremamente pequenas ( $10^{-12}$  a  $10^{-9}$  gramas, ou menos).

Segundo Evershed e Morgan (1983), o volume representado pelo feromônio de trilha, na glândula de veneno de quatro espécies, de formigas cortadeiras, a saber: *A. cephalotes*, *A. sexdens rubropilosa*, *A. sexdens sexdens*, *Acromyrmex octospinosus* constitui menos que 0,1% do volume total da secreção desta glândula.

A fração protéica da secreção da glândula de veneno de duas espécies de formigas cortadeiras, *A. cephalotes* e *Acromyrmex octospinosus* foi caracterizada através de eletroforese. O perfil protéico das secreções desta glândula nas duas espécies é constituído por trinta e cinco bandas de polipeptídeos e a principal diferença entre as secreções das duas espécies foi observada entre os polipeptídeos de baixo peso molecular (<30 KDa) (DO NASCIMENTO, 1994).

#### 1.3.4 As Glândulas Metapleurais

As glândulas metapleurais, exclusiva de formigas, constituem um agregado de células glandulares localizadas no metatórax. Cada célula é constituída por um ducto que transporta a secreção produzida para um saco membranoso, sendo posteriormente transportada para o exterior por capilaridade (SCHOETERS; BILLEN, 1993).

A secreção destas glândulas, em formigas cortadeiras, é constituída por uma mistura de ácidos carboxílicos e nas espécies em que foram caracterizadas, tais como: *A. sexdens sexdens*, *A. sexdens rubropilosa* e *A. cephalotes* quimicamente apresentam diferenças no tocante as proporções de cada componente (DO NASCIMENTO, 1994; DO NASCIMENTO et al., 1996). Os constituintes destas secreções também apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica, principalmente no que se refere a alguns microorganismos causadores de patologias em seres humanos, como é o caso de *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (MENDONÇA et al., 2009).

#### 1.4 Extração, Atividade Biológica e Identificação dos Feromônios de Insetos

Os feromônios de insetos são produzidos, armazenados e liberados em quantidades extremamente pequenas ( $10^{-12}$  a  $10^{-9}$  gramas, ou menos) e, geralmente constituem uma mistura multicomponente, de modo que as técnicas convencionais de extração e identificação de produtos naturais, que requerem uma quantidade maior de material proveniente do inseto (geralmente  $10^3$  microgramas), não são adequadas para as análises dos mesmos.

A pesquisa voltada para a caracterização completa dos feromônios de insetos envolve basicamente quatro etapas: i) a extração do feromônio ou da glândula exócrina associada à produção e armazenamento do feromônio do corpo do inseto em estudo; ii) a comprovação da atividade biológica (feromonal) do extrato obtido através de bioensaios específicos; iii) a determinação da composição química do feromônio em estudo pelo emprego de técnicas analíticas específicas e, iv) a preparação ou obtenção dos mesmos em laboratório ou comercialmente para

comprovar a sua identidade, além dos testes laboratoriais e de campo onde os compostos puros ou em solução são testados separadamente e em misturas.

A primeira etapa da pesquisa que visa a caracterização de um feromônio consiste na preparação de extratos da parte do corpo do inseto relacionada a produção e/ou armazenamento do feromônio em estudo, quando já existe evidências de que sinais químicos mediam as interações entre organismos coespecíficos (DO NASCIMENTO; SANT'ANA, 2001). Para tanto, os extratos podem ser obtidos através da passagem de solvente através de tubos contendo polímeros adsorventes, tais como o Porapak Q e Tenax, onde as moléculas do feromônio foram adsorvidas, pelo emprego da técnica de aeração ou preparados mediante maceração ou lavagem da glândula exócrina onde o feromônio em estudo está armazenado, utilizando solventes orgânicos, tais como: hexano, diclorometano, éter etílico. Estes solventes devem apresentar baixo ponto de ebulição e um grau aceitável de pureza (grau HPLC) ou serem destilados para a remoção de impurezas no caso dos solventes de grau P.A. (DO NASCIMENTO; SANT'ANA, 2001; ZARBIN, 2001).

A etapa subsequente à preparação dos extratos consiste em testá-los em bioensaios comportamentais, a fim de verificar a sua atividade biológica. Em caso positivo, estes testes irão demonstrar a modificação do comportamento do inseto, como resultado de sua exposição ao feromônio. O objetivo dos bioensaios comportamentais é identificar e quantificar a resposta do inseto frente a uma fonte de estímulo. A resposta do inseto ao extrato testado consiste de uma sequência específica de movimentos característicos em direção a fonte de emissão do odor evidenciando a percepção do estímulo (SANT'ANA; STEIN, 2001).

Existe uma grande variedade de bioensaios que podem ser realizados e a escolha do sistema mais adequado dependerá da biologia e do comportamento do inseto em estudo (EIRAS; MAFRA NETO, 2001; SANT'ANA; STEIN, 2001). A resposta da antena de insetos também é empregada para verificar a atividade de substâncias presentes em extratos provenientes de insetos. Esta técnica é denominada eletroantenografia e serve principalmente para indicar quais substâncias presentes no extrato testado possuem receptores na antena do inseto.

No entanto, ela não indica o tipo de resposta comportamental vinculada à substância eletrofisiologicamente ativa (DO NASCIMENTO; SANT'ANA, 2001).

Dentre os métodos modernos empregados na determinação da composição química de um feromônio, a cromatografia gasosa é a melhor opção devido a uma série de fatores, destacando-se dentre eles: 1) o fato de que, a maioria dos feromônios é constituída por uma mistura de substâncias voláteis ou volatilizáveis; 2) a relativa facilidade com que se efetua a separação, a identificação e a quantificação das substâncias presentes na mistura feromonal, pela possibilidade de acoplamento desta técnica com outras técnicas instrumentais de análises, como é o caso da espectroscopia na região do infravermelho e da espectrometria de massas e 3) o limite de detecção do instrumento, em particular, do espectrômetro de massas, que é de aproximadamente 10 ng (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) constitui uma técnica valiosa na identificação de feromônios. O cromatógrafo a gás (CG) separa os componentes de uma mistura, enquanto o espectrômetro de massa (EM) fornece informações sobre as estruturas dos compostos, além de funcionar como um detector extremamente sensível cujo limite de detecção é aproximadamente 10 pg (DO NASCIMENTO; SANT'ANA, 2001).

Na identificação de feromônios, o método de ionização mais utilizado é o impacto eletrônico (EI) onde as moléculas são bombardeadas por um feixe de elétrons de alta energia, normalmente 70 eV, causando a retirada de um dos elétrons da camada mais externa de alguns átomos presentes na molécula, produzindo um íon positivo denominado íon molecular. Devido ao excesso de energia fornecido pelo bombardeio eletrônico, o íon molecular fragmenta-se dando origem aos fragmentos iônicos que caracterizam um espectro de massas, os quais apresentam intensidades diferentes e que dependem de sua estabilidade química. O íon molecular é o fragmento que apresenta a maior massa no espectro. Entretanto, o íon que apresenta maior intensidade é denominado pico base e a intensidade dos demais fragmentos iônicos são fornecidos em função do pico base (DO NASCIMENTO; SANT'ANA, 2001).

Outro método de ionização utilizado, quando o íon molecular é energeticamente instável, é a ionização química. Neste método, um gás reagente, presente em excesso na câmara de ionização, é ionizado através de bombardeio com um feixe de elétrons e, uma vez ionizado, o gás reagente pode adicionar ou subtrair um próton da substância que está sendo investigada. O espectro de massas apresenta o íon estável, denominado íon *quasi-molecular* e alguns íons resultantes da fragmentação subsequente do íon *quasi-molecular* (DO NASCIMENTO; SANT'ANA, 2001).

Em geral, o espectro de massas de um composto apresenta informações referentes à sua massa molecular e os fragmentos iônicos decorrentes de fragmentações subsequentes do íon molecular provê informações relacionadas à estrutura da molécula. Além destas informações, as compilações de espectros de massas disponíveis para consulta, como é o caso de Stenhagen et al. (1974) e os bancos de dados disponíveis no computador que armazenam os dados das análises de compostos pelo emprego da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, também auxiliam no processo de identificação das estruturas dos compostos de interesse (DO NASCIMENTO; SANT'ANA, 2001).

Os espectrômetros de massas geralmente fornecem o espectro de massas de um composto em particular, apresentando todos os íons característicos de um determinado composto, este processo é conhecido como método SCAN. Entretanto, o instrumento também pode ser preparado para efetuar a varredura e selecionar apenas alguns íons característicos de uma substância em particular, esta técnica é conhecida como fragmentografia de massas ou *selected ion detection (SIM)*. A técnica *SIM* é mais sensível que a SCAN, porém fornece um espectro de massas incompleto e o seu uso só é aconselhável quando o espectro de massas completo da substância de interesse já foi obtido pela técnica SCAN (DO NASCIMENTO; SANT'ANA, 2001).

## REFERÊNCIAS

ALI, M. F.; MORGAN, E. D. Chemical communication in insect communities: A guide to insect pheromones with special emphasis on social insects. **Biological Reviews**, v. 65, p. 227-247, 1990. ISSN 1469-185X.

BILLEN, J.; BEECKMAN, W.; MORGAN, E. D. Active trail pheromone compounds and following in the ant *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). **Ethology, Ecology and Evolution**, v. 4, p. 197-202, 1992. ISSN 0394-9370.

BLUM, M. S. Alarm pheromones. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 14, p. 157-180, 1968. ISSN 0066-4170.

\_\_\_\_\_; HERMANN, H. R. The hymenopterous poison gland: probable functions of the main glandular elements. **Journal of the Georgia Entomological Society**, v. 4, p. 23-28. 1969. ISSN 0016-8238.

\_\_\_\_\_. et al. 2-Hexanal: isolation and function in *Crematogaster (Atopogyne)* sp. **Journal of the Georgia Entomological Society**, New York, v. 4, p. 145-148, 1969. ISSN 0016-8238.

BUTENANDT, A.; LINZEN, B.; LINDAUER, M. Über einen geschlechtsspezifischen duftstoff der mandibeldrüse der blattscheiderameise *Atta sexdens rubropilosa* forel. **Archives d' Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale**, Paris, v. 48, p.13-19, 1959. ISSN 0003-9594.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**, Campinas: Editora da UNICAMP, 2006 p.

CREWE, R. M.; BLUM, M. S. Alarm pheromones of Attini: their phylogenetic significance. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 18, p. 31-42, 1972. ISSN 0022-1910.

CROSS, J. H.; WEST, J. R.; SILVERSTEIN, R. M. Trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae: Myrmicinae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 8, n. 8, p. 1119-1124, 1982. ISSN 0098-0331.

\_\_\_\_\_. et al. The major component of the trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae: Myrmicinae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 8, n. 8, p. 1119-1124, 1979. ISSN 0098-0331.

DO NASCIMENTO, R. R. **Chemical studies of pheromones and exocrine secretions of myrmicine and ponerine ants**. 1994. 225 f. Tese (Doutorado em Química) - University of Keele, Staffordshire, 1994.

\_\_\_\_\_; MORGAN, E. D. Chemicals involved in the communication system of social insects: their source and methods of isolation and identification, with special emphasis on ants. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 156-165, 1996. ISSN 0100-4042.

DO NASCIMENTO, R. R.; SANT'ANA, A. E. G. Isolamento e identificação dos semioquímicos de insetos sociais. In: VILELA, E. F.; DELLA Lucia, T. M. C. (Ed.). **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas** 2. ed. Ribeirão Preto: Holos. 2001. p. 65-71.

\_\_\_\_\_. et al. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes*, and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, n. 5, p. 987-1000, 1996. ISSN 0098-0331.

\_\_\_\_\_. et al. Trail pheromone of leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus* (Forel). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 1719-1724, 1994. ISSN 0098-0331.

\_\_\_\_\_. et al. Variation with the caste of the mandibular gland secretion in the leafcutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, p. 907-918, 1993. ISSN 0098-0331.

EIRAS, A. E.; MAFRA NETO, A. Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos. 2001. p. 27-39.

EVERSHED, R. P.; MORGAN, E. D. The amounts of trail pheromone substance in the venom of worker of four species of Attine ants. **Insect Biochemistry**, Bristol, v. 13, n. 5, p. 469-479, 1983. ISSN 0020-1790.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Chemical investigation of dufour gland contents of attine ants. **Insect Biochemistry**, Bristol, v. 11, p. 343-351, 1981. ISSN 0020-1790.

EVERSHED, R. P.; MORGAN, E. D. A chemical study of dufours glands of two Attine ants. **Insect Biochemistry**, Bristol, v. 10, p. 81-86, 1980. ISSN 0020-1790.

FRANCELINO, M. R. V. et al. The mandibular gland secretions of the leaf-cutting ants *Atta sexdens sexdens* and *A. opaciceps* exhibit inter-caste and inter-colony variation. **Journal of Chemical Ecology**. New York, v. 32, n. 3, p. 646-655, 2006. ISSN 0098-0331.

\_\_\_\_\_. et al. Polyethism and nestmate recognition in the alarm reaction of *Atta* leaf-cutting ants. **Physiological Entomology**, London, v. 33, p. 37-42, 2008. ISSN 0307-6962.

HERNÁNDEZ, J. V.; CABRERA, A.; JAFFE, K. Mandibular gland secretion in different castes of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*. **Journal of Chemical Ecology**. New York, v. 25, n. 11, p. 2433-2444, 1999. ISSN 0098-0331.

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

HUGHES, W. O. H.; GOULSON, D. Polyethism and the importance of context in the alarm reaction of the grass-cutting ant, *Atta capiguara*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 49, p. 503-508, 2001b. ISSN 0340-5443.

\_\_\_\_\_; HOWSE, P. E.; \_\_\_\_\_. Mandibular gland chemistry of grass-cutting ants: species, caste and colony variation. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 27, p.109-124, 2001a. ISSN 0098-0331.

KEEGANS, S. J. et al. Volatile glandular secretions of three species of new world army ants, *Eciton burchelli*, *Lepidus coecus* and *Lepidus praedator*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 11, p. 2705-2719, 1993. ISSN 0098-0331.

MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970.

MARTINEZ, O. M. M. **Identificação de feromônio de trilha de formigas cortadeiras (Formicidae: Attini)**. 74 f. 1988. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Unniversidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

MENDONCA, A. L. et al. Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 95, p. 295-303, 2009. ISSN 0003-6072.

MINTZER, A.; VINSON, S. B. Kinship and incompatibility between colonies of the acaciaant *Pseudomyrmex ferruginea*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. v. 17, p.75-78, 1985. ISSN 0340-5443.

MOREIRA, D. D. O. **A glândula doferomônio de trilha e efeito deste naorientação de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae)**. 1992. 75 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1992.

MOSER, J. C.; BROWNLEE, R. C.; SILVESTEIN, R. Alarm pheromones of the ant *Atta texana*. **Journal of Insect Physiology, Oxford**, v. 14, p. 529-535, 1968. ISSN 0022-1910.

OLIVEIRA, J. S. **Estudo dos feromônios de *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta robusta***. 1975. 92 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeir, Rio de Janeiro, 1975.

\_\_\_\_\_. et al. Componentes do feromônio de trilha das formigas cortadeiras *Atta laevigata* e *Atta bisphaerica* Forel (Formicidae: Attini). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 143-154. 1990. ISSN 0301-8059.

RILEY, R. G.; SILVERSTEIN, R. M.; MOSER, J. C. Isolation, identification, synthesis and biological activity of volatile compounds from the heads of *Atta*. **Journal of Insect Physiology, Oxford**, v. 20, p. 1629-1637, 1974b. ISSN 0022-1910.

RILEY, R. G. et al. Methyl 4-methylpyrrole-2-carboxylate in a volatile pheromone from the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 20, p. 651-654, 1974a. ISSN 0022-1910.

SALZEMANN, A.; JAFFÉ, K. On the territorial behavior of field colonies of the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 36, p. 133-138, 1990. ISSN 0022-1910.

\_\_\_\_\_. et al. Leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Formicidae: Attini) Marks its territory with colony specific Dufour gland secretion. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 18, n. 2, p. 183-196, 1992. ISSN 0098-0331.

SANT'ANA, J.; STEIN, K. Extração e Identificação de substâncias bioativas de insetos. In: FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. (Org.). **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: Editora da UFSCAR, 2001. p. 47-74.

SCHOETERS, E.; BILLEN, J. Anatomy and fine structure of metapleural gland in *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). **Belgian Journal of Zoology**, Oxford, v. 123, p. 67-75, 1993. ISSN 0777-6276.

STENHAGEN, E.; ABRAHAMSON, S.; MACLAFFERTY, F. W. Registry of mass spectral data. 1<sup>st</sup> ed. New York: J. Wiley & Sons, 1974.

TUMLINSON, J. H.; SILVERSTEIN, R. M.; MOSER, J. C. Identification of the trail pheromone of leaf-cutting ant, *Atta texana*. **Nature**, London, v. 234, p. 348-349, 1971. ISSN 0028-0836.

\_\_\_\_\_. et al. A volatile trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Atta texana*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 18, p. 809-814, 1972. ISSN 0022-1910.

VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. Introdução aos semioquímicos e terminologia. In: \_\_\_\_\_. (Org.). **Feromônios de insetos**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 9-12.

WILSON, E. O.; BOSSERT, W. H. Chemical communication among animals. **Recent Progress in Hormone Research**, New York, v. 17, p. 673-716, 1963. ISSN 0079-9963.

\_\_\_\_\_.; DURIACH, N. I.; ROTH, L. M. Chemical releaser of necrophoric behaviour in ants. **Psyche**, Cambridge, v. 65, p. 108-114, 1958. ISSN 0033-2623.

ZARBIN, P. H. G. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 45-50.

**CAPITULO 2 – POLIETISMO E RECONHECIMENTO INTRA E INTER-  
ESPECÍFICO DO FEROMÔNIO DE TRILHA DE *Atta*  
*opaciceps***

## RESUMO

Feromônios de trilha possuem uma função vital na comunicação química de formigas cortadeiras. No presente trabalho buscou-se compreender o comportamento das formigas das diversas castas de *Atta opaciceps*, comparando-o ao comportamento de forrageiras de *Atta cephalotes* e *Atta sexdens sexdens*, em trilha, sob condições de laboratório. Formigas foram coletadas e os extratos preparados a partir da dissecação na região abdominal, com retirada da glândula de veneno seguida de maceração da mesma em hexano. Os bioensaios foram divididos em três etapas, na primeira, quatro castas de *A. opaciceps* foram submetidas ao extrato da casta forrageira. A segunda etapa buscou respostas das formigas de *A. opaciceps* pertencentes à casta forrageira submetidas a extratos de mesma e de outras castas. Na terceira etapa, o comportamento de trilha de diferentes espécies foi comparado entre si. No primeiro experimento, extratos de feromônio de trilha da casta forrageira eliciaram respostas comportamentais nas demais castas. Os extratos não eliciaram respostas da casta jardineira. Na segunda fase, observou-se que o extrato de todas as castas pode eliciar comportamento na casta, forrageira, com a resposta para extratos de operárias de sua própria casta diferindo das demais. No terceiro experimento, os comportamentos de trilha exibidos por forrageiras de *A. opaciceps* frente aos extratos de glândulas de veneno de forrageiras de mesma espécie e de extratos de glândula de veneno de forrageiras de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* não diferiram entre si. Entretanto, a resposta comportamental de forrageiras de *A. opaciceps* diante de extratos de glândulas de veneno de forrageiras das espécies e de *A. cephalotes*, *A. sexdens sexdens* e *A. sexdens rubropilosa* foi significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ). O tratamento controle (trilha com hexano) não eliciou comportamento de trilha em forrageiras de *A. opaciceps* ( $p \leq 0.05$ ). Os resultados sugerem que em *Atta opaciceps* a casta forrageira é a responsável pelo eliciamento de respostas nas demais detectando de maneira mais eficiente, o seu próprio feromônio. Além disso, existe similaridade de respostas em relação ao seguimento de trilha para esta espécie comparando-se com a espécie *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. As análises químicas dos extratos hexânicos de glândulas de veneno de forrageiras de *A. opaciceps* por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) revelaram a presença de três compostos nitrogenados, os quais foram identificados como sendo: a 2,5-dimetilpirazina, a 3-etil-2,5-dimetilpirazina e o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila, nas concentrações relativas de 0,11 ng, 7,84 ng e menos que 0.1 ng (traço), respectivamente.

**Palavras-chave:** Feromônio de trilha. Formigas cortadeiras. Polietismo. Reconhecimento intraespecífico.

## ABSTRACT

Trail pheromones play a vital role in the chemical communications of leaf-cutting ants. This study aimed to clarify details relating to the trail behaviour of *Atta opaciceps* by examining, under laboratory conditions, how different castes discriminate between venom glands extracts from nestmates and from other species. Ants of all castes were collected at the entrances of their nests or along the distinct foraging trails, and extracts were obtained by maceration of venom glands with hexane. Three different bioassays were performed: (i) gardeners, generalists, foragers and soldiers of *A. opaciceps* were exposed to extracts from nestmate foragers; (ii) foragers of *A. opaciceps* were exposed to extracts from nestmates of all four castes; and (iii) foragers of *A. opaciceps* were exposed to extracts from nestmate foragers and foragers of *A. sexdens sexdens* and *A. cephalotes*. The order of response of *A. opaciceps* castes to the trail pheromone from nestmate foragers was foragers  $\approx$  generalists  $>$  soldiers  $>$  gardeners, while the response of *A. opaciceps* foragers to the venom gland extracts from nestmate castes was foragers  $>$  gardeners  $\approx$  generalists  $\approx$  soldiers. *A. opaciceps* foragers are clearly more sensitive to nestmate pheromones than the other castes. The venom extract from *Acromyrmex subterraneus subterraneus* foragers was as effective as that from nestmate foragers in eliciting a trail-following response in foragers of *A. opaciceps*, whilst those from foragers of *A. cephalotes*, *A. sexdens sexdens* and *A. sexdens rubropilosa* significantly differ ( $p \leq 0.05$ ). The control treatment did not elicit any trail-following behaviour in foragers of *A. opaciceps* ( $p \leq 0.05$ ). Chemical analyses of hexane extracts from venom glands of foragers of *A. opaciceps* by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) revealed three nitrogenated compounds, which were identified as: 2,5-dimethylpirazine, 3-ethyl-2,5-dimethylpirazine and methyl 4-methylpyrrole-2-carboxylate in relative concentrations of 0,11 ng, 7,84 ng and less than 0,1 ng, respectively.

**Keywords:** Trail pheromone. Leaf-cutting ants. Polyethism. Nestmate recognition.

## INTRODUÇÃO

Conforme Wilson (1987), aproximadamente 15000 espécies de formigas ocorrem no mundo, das quais apenas 8.000 estão descritas. Dentre as espécies descritas, as que pertencem aos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae), conhecidas como formigas cortadeiras, merecem destaque devido à sua relevância ecológica e importância econômica. As formigas desses dois gêneros possuem um eficiente comportamento polífago, coletando diversos materiais vegetais durante todo o ano e, este comportamento ocorre ao longo de trilhas marcadas quimicamente através de feromônio de trilha, além das trilhas físicas.

Os feromônios de trilha representam um elemento vital no sistema de comunicação de insetos sociais terrestres, como é o caso das formigas. As substâncias ativas são produzidas em glândulas exócrinas cujas aberturas estão diretamente relacionadas com o substrato ou alvo (BILLEN; BEECKMAN; MORGAN, 1992).

Em formigas cortadeiras, a produção de feromônio de trilha é atribuída à glândula de veneno localizada na porção terminal do abdômen (TUMLINSON et al., 1972; EVESHED; MORGAN, 1983; BILLEN; BEECKMAN; MORGAN, 1992). O primeiro composto ativo de trilha identificado em formigas o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (M4MPC), foi isolado a partir da glândula de veneno de formigas cortadeiras da espécie *Atta texana* (TUMLINSON et al., 1971, 1972). O mesmo composto foi subsequentemente identificado como o feromônio de trilha de duas outras espécies, *Atta cephalotes* (RILEY et al., 1974) e *Acromyrmex octospinosus* (CROSS et al., 1982).

Em 1982, Cross et al., atribuíram o feromônio de trilha de *Atta sexdens rubropilosa* como sendo o composto 3-etil-2,5-dimetilpirazina (EDMP), posteriormente, Evershed e Morgan (1983) também o identificaram em *Atta sexdens sexdens*. Nove anos depois, Billen, Beeckman e Morgan (1992) identificaram a mistura binária composta por EDMP e M4MPC na proporção de 14:1 como o feromônio de trilha de *Atta sexdens sexdens*.

Colônias de insetos sociais são compostas de indivíduos com notável variação no tamanho do corpo e outros aspectos morfológicos, os quais são considerados uma adaptação que facilita sua distribuição e divisão de trabalho (WILSON, 1971; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Tais diferenças podem ser atribuídas ao às condições ambientais, bem como ao efeito genético (OLDROYD; FEWELL, 2007). Alguns trabalhos têm demonstrado que existe uma influência genotípica sobre o comportamento dentro das castas (HUGHES et al., 2003; HUGHES; BOOMSMA, 2007). Em *Acromyrmex echinator*, o comportamento de forrageamento e manejo de lixo é influenciado por seu genótipo, apesar de outros fatores também serem importantes (WADDINGTON et al., 2010).

A resposta comportamental destas espécies é descrita pela probabilidade de uma operária responder ao estímulo associado a uma tarefa. A divisão de trabalho é vista como uma propriedade emergente, baseada nas variações qualitativas e quantitativas das respostas individuais (BESHERS; FEWELL, 2001).

Diversos estudos descrevem diferenças da resposta a estímulos externos em operárias de diferentes tamanhos. Em *Atta capiguara*, operárias menores respondem mais fracamente diante de uma reação de alarme quando expostas às cabeças maceradas ao longo de trilhas de forrageamento (HUGHES; GOULSON, 2001), como também Francelino et al. (2006) demonstraram que extratos hexânicos de cápsulas cefálicas de operárias menores de *A. sexdens sexdens* e *Atta opaciceps* eliciam alto nível de resposta de alarme em forrageiras de mesma colônia. Além disso, operárias menores de *Atta sexdens sexdens* apresentam uma fidelidade de trilha maior do que operárias maiores (MORGAN et al., 2006).

Dentro da sociedade das formigas existe uma evidente diferenciação de comportamentos quanto à divisão do trabalho, fenômeno este denominado de polietismo (SUDD, 1967). Outro fenômeno adjacente, o aloetismo, consiste na probabilidade de desempenho de uma tarefa específica em função do tamanho do corpo da operária. Este último, se intensifica quando as operárias estão envolvidas no forrageamento e processamento vegetal para a obtenção e geração de recursos alimentares (WILSON, 1980, 1983).

Alguns autores sugerem que a diferença no processamento da informação referente ao estímulo de odor pelas operárias está relacionada à sua neuroanatomia e isto provavelmente resulta em diferentes comportamentos guiados pelo olfato (KLEINEIDAM et al., 2005). As operárias diferem em sua propensão para se engajar em uma tarefa particular (WADDINGTON et al., 2010). Fenotípicamente, a evidência morfológica de efeito genético tem sido encontrada em diversas formigas com indivíduos diferindo de acordo com a sua função dentro da colônia (HUGHES et al., 2003; JAFFÉ et al., 2007; WADDINGTON et al., 2010).

Entender os comportamentos das formigas cortadeiras em sua múltipla divisão de trabalho constitui uma etapa necessária para estabelecer a convivência com estas, além de desenvolver e, ou adaptar novos métodos de controle, quando essas atingem o nível de dano econômico. Dessa forma, o presente estudo buscou esclarecer o comportamento de *A. opaciceps* quanto à especificidade do comportamento de trilha, verificando como as diversas castas respondem a diferentes extratos intra e interespecíficos (*Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *A. cephalotes*, *A. sexdens sexdens* e *A. sexdens rubropilosa*) sob condições de laboratório e identificar os constituintes químicos presentes nos extratos de glândula de veneno de forrageiras de *A. opaciceps*, objetivando identificar os compostos responsáveis pelo eliciamento do comportamento de trilha em forrageiras desta espécie.

## 2.1 Objetivos Específicos

1. Verificar, através de bioensaios comportamentais, se extratos obtidos da glândula de veneno de *A. opaciceps* diferem no eliciamento de resposta entre castas desta espécie, a fim de determinar a casta responsável por esta função;
2. Verificar, através de bioensaios comportamentais, como as diferentes castas de *A. opaciceps* responde a extratos obtidos da glândula de veneno da casta responsável pelo eliciamento de resposta de trilha, a fim de determinar àquela que responde de maneira mais eficiente a este feromônio;
3. Comparar a resposta comportamental de *A. opaciceps* diante de extratos obtidos da glândula de veneno das espécies *A. sexdens sexdens* e *A.*

*cephalotes* e *A. sexdens rubropilosa* a fim de determinar se existe similaridade de resposta entre espécies diferentes pertencentes ao mesmo gênero, como também *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, em relação ao feromônio de trilha;

4. Identificar os constituintes químicos presentes nos extratos de glândulas de veneno de forrageiras de *A. opaciceps* empregando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Coleta de Insetos

As formigas das espécies *A. opaciceps*, *A. sexdens sexdens* e *A. cephalotes*, foram coletadas em ninhos localizados no Campus Aristóteles Calazans Simões da Universidade Federal de Alagoas, sempre no mesmo horário entre 08 e 10 horas, o qual coincidiu com seus horários de forrageamento.

Durante o experimento, o ninho selecionado foi protegido da aplicação de iscas tóxicas, presença de coivaras (fogo), escavações no entorno, dentre outras perturbações. Assim, as formigas foram coletadas, com auxílio de pinças entomológicas limpas, tanto na entrada do ninho como também nas suas trilhas de forrageamento, de maneira cuidadosa, evitando assim a liberação excessiva de compostos voláteis pelas mesmas.

Em seguida, os espécimes foram acondicionados em caixa de acrílico (20 cm altura x 50 cm comprimento x 30 cm largura) forrada com folhagem. Posteriormente, foram levadas ao laboratório para serem imediatamente empregadas na preparação dos extratos e nos bioensaios.

Para as espécies *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *A. sexdens rubropilosa*, os extratos foram preparados pelos Laboratório de Semioquímicos da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) e do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) respectivamente e gentilmente enviados para o laboratório de Ecologia Química (UFAL).

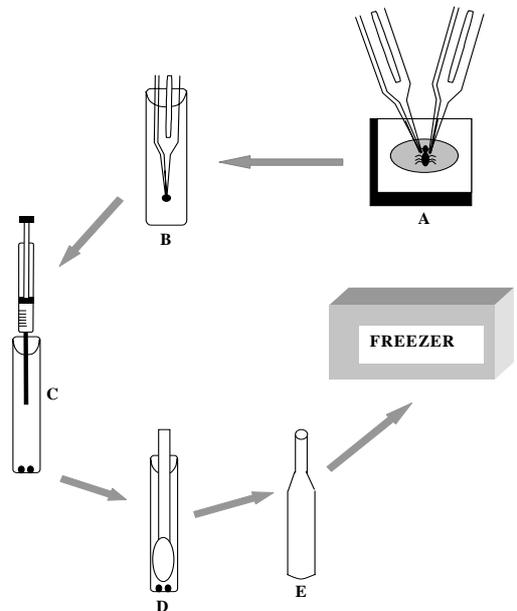
### 2.2.2 Identificação da Espécie

A identificação das espécies de formigas cortadeiras *A. opaciceps*, *A. cephalotes*, *A. sexdens sexdens*, já havia sido realizada, por Francelino et al. (2006), o qual, seguindo protocolo específico, coletou 10 exemplares da espécie, de diferentes castas e distribuíram da seguinte forma: 4 soldados, 2 forrageiras, 2 generalistas e 2 jardineiras. Sendo os exemplares acondicionados, separadamente, em frascos de vidro contendo solução de etanol 70%, devidamente etiquetados e posteriormente enviados para o taxonomista especialista em formigas, Dr. Jacques H. C. Delabie do Laboratório de Mirmecologia - CEPEC/CEPLAC - Itabuna-Bahia, o qual utilizando-se de caracteres morfológicos tais como: estrutura da cápsula cefálica, coloração e pêlos do gáster, espinhos e lobos occipitais, dentre outros, identificou os espécimes, os quais estão depositados no acervo do referido Centro de Pesquisa.

### 2.2.3 Preparação dos Extratos

As formigas coletadas foram colocadas no freezer (- 4°C) durante 20 minutos para posterior preparo dos extratos. Em seguida, a região abdominal das mesmas foi dissecada, com auxílio de pinças, sob microscópio estereoscópio (Wild Leica M3B). Após a extração das glândulas de veneno, os extratos foram obtidos através da maceração das mesmas, na proporção de 20 glândulas/500 µL de hexano HPLC (Figura 1). Uma vez obtidos, os extratos foram transferidos para ampolas de 2 mL, que foram seladas e etiquetadas e imediatamente armazenadas em freezer mantidas em temperatura constante (- 4° C).

**Figura 1 – Metodologia empregada na preparação de extratos de feromônio de trilha de *Atta opaciceps*, onde: A = extração da glândula de veneno; B = transferência da glândula para o macerador; C = adição de hexano; D = maceração; E = transferência para ampola de 2 mL, sendo selada e acondicionada em freezer (F).**



Fonte: Francelino, 2004.

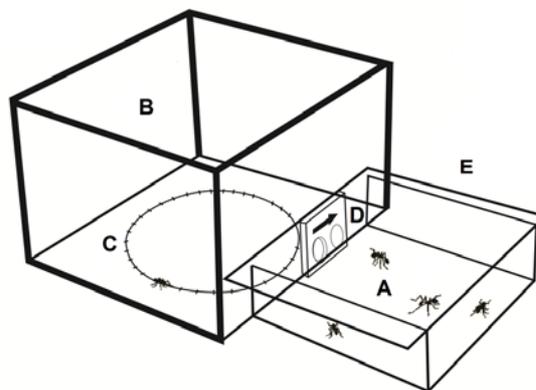
#### 2.2.4 Bioensaios sob Condições de Laboratório

Os bioensaios foram conduzidos em uma sala climatizada com temperatura média de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa do ar, localizada no Laboratório de Ecologia Química, do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas, entre 10 e 11 horas no período de janeiro a abril de 2009. Durante os bioensaios foi utilizada uma lâmpada vermelha de 15W para facilitar as observações, uma vez que os insetos, tais como as formigas não são capazes de enxergar nesse comprimento de onda e deste modo não são influenciados pela luz.

As observações foram feitas em arena descrita por Billen, Beeckman e Morgan (1992) (Figura 2). As formigas ( $n=10$ ) foram colocadas na antecâmara (A) e  $100 \mu\text{L}$  do extrato (4 glândulas/ $100 \mu\text{L}$ ) a ser testado foram depositados em câmara principal (B), com auxílio de seringa de vidro sobre disco papel de filtro (Whatman® nº 1) vazado (C) com raio de 4,7 cm divididos em 35 arcos. O início de um bioensaio

ocorria após a liberação das formigas, através de uma porta deslizante (D) para a câmara principal, onde permaneciam durante 10 minutos. Logo após esse tempo, as formigas eram retiradas, bem como o papel de filtro. A câmara principal e a antecâmara eram limpas com algodão embebido com água destilada, e uma nova repetição se iniciava. A quantificação das respostas foi feita através da determinação do somatório do número de arcos percorridos pelas 10 formigas, com auxílio de um contador manual.

**Figura 2 – Arena de bioensaios, onde: A: antecâmara, B: câmara principal, C: disco de papel, D: porta deslizante e E: tampa**



Fonte: Bille; Beeckman; Morgan, 1992.

### 2.2.5 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas

Os estudos etológicos compreenderam três diferentes bioensaios. No primeiro experimento, diferentes castas de *A. opaciceps*, denominadas, jardineiras, generalistas, forrageiras e soldados foram expostas a extratos de forrageiras intra-específicas. No segundo experimento, forrageiras de *A. opaciceps* foram expostas a extratos de jardineiras, generalistas, forrageiras e soldados intra-específicos. No terceiro experimento, forrageiras de *A. opaciceps* foram expostas a extratos de glândulas de veneno de forrageiras co-específicas e daqueles derivados de forrageiras de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *A. cephalotes*, *A. sexdens sexdens* e *A. sexdens rubropilosa* (inter-específicos). Dez formigas foram utilizadas nos ensaios para cada tipo de interação e foram conduzidas quatro repetições por tratamento. Para cada experimento, um bioensaio foi conduzido com papel de filtro impregnado somente com hexano o qual serviu como controle. A variável analisada

foi o número de arcos percorridos pelas formigas. Sendo o delineamento inteiramente casualizado.

Foram observados os pressupostos paramétricos, sendo utilizado o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias dos erros ( $p \geq 0,05$ ) e o teste de Lilliefors para a normalidade dos mesmos erros. Para comparações múltiplas foi utilizado o teste de Tukey-HSD além do teste de Dunnett-t para comparação dos tratamentos diante do controle. Em todos os casos o nível de significância estatística foi fixado em  $\alpha = 5\%$ .

#### 2.2.6 Análises Químicas dos Extratos

As análises químicas dos extratos de glândulas de veneno de formigas forrageiras de *A. opaciceps* foram executadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), utilizando o cromatógrafo gasoso da Shimadzu Corporation modelo 17A, acoplado a um detector seletivo de massas QP5050, ambos controlados por um computador Pentium Dual Core 200MHZ, para processar os dados armazenados.

Os componentes químicos presentes nos extratos foram separados em coluna capilar com fase estacionária apolar (polidimetilsiloxano, 25mm x 0,32mm de diâmetro interno x 0,5 $\mu$ m espessura do filme de fase estacionária). As zonas de aquecimento do cromatógrafo foram programadas para operar nas seguintes temperaturas: Injetor 200°C, forno 30°C – com velocidade de aquecimento de 8°C/min até atingir a temperatura de 250°C e detector 270°C. O modo de injeção para os extratos foi o “splitless”, ou seja, sem divisão da amostra. O gás de arraste utilizado foi o Hélio (1mL/min) e a energia de ionização foi de 70eV.

As análises prévias dos extratos empregando-se o método de varredura SCAN apresentaram como constituintes dos mesmos, compostos oriundos da glândula de Dufour. Todavia, como a concentração dos constituintes voláteis presentes na secreção da glândula de veneno das espécies de *Atta*, estudadas até o presente momento estava abaixo do limite de detecção do espectrômetro de massa (0.1ng) que opera sob o modo SCAN, utilizou-se, neste estudo o método de varredura SIM (selected ion monitoring), escolhendo-se os íons listados na Tabela 1,

os quais são característicos dos compostos presentes nos extratos da glândula de veneno de espécies de *Atta* já estudadas (CROSS et al.,1982; EVERESHED; MORGAN,1983; BILLEN; BEECKMAN; MORGAN,1992).

**Tabela 1 – Íons característicos das substâncias escaneadas e monitoradas empregando a técnica de varredura SIM em extratos das glândulas de veneno de *Atta opaciceps*.**

Composto	Íons Característicos Escaneados
Íons característicos escaneados	108, 81, 42, 40, 39
4-Metilpirrol-2-carboxilato de metila	139, 108, 107, 79 e 53
3-Etil-2,5-dimetilpirazina	136, 135, 108, 56 e 42

Fonte: Autor, 2011

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Avaliação do comportamento intra-específico de trilha de *A.opaciceps*

Extratos obtidos das glândulas de veneno de forrageiras de *A. opaciceps* eliciaram uma resposta significativamente ( $p < 0,05$ ) maior em forrageiras e generalistas em comparação com soldados e, além disto, não induziu resposta em jardineiras (Tabela 2). Por sua vez, extratos obtidos das glândulas de veneno de forrageiras de *A. opaciceps* induziram uma resposta para a mesma casta que também foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que àquela induzida por extratos derivados de jardineiras, generalistas e soldados (Tabela 3). O tratamento controle (hexano) não eliciou resposta em nenhum dos bioensaios realizados.

**Tabela 2 – Resposta das quatro castas de *Atta opaciceps* diante do extrato das glândulas de veneno de formigas da casta forrageira.**

Casta exposta ao extrato	Número de arcos seguidos pela casta exposta em um período de 10 min (Média ± D.P.)
	Extrato de forrageiras co-específicas
Hexano (controle)	0.0 ± 0.0 aA
Jardineiras	0.0 ± 0.0 aA
Generalistas	198.75 ± 45.71 bC
Forrageiras	391.25 ± 71.74 bC
Soldados	117.5 ± 41.56 bB

Fonte: Autor, 2011.

Nota: Em uma mesma coluna, letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre médias (teste de Tukey-HSD,  $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa dos tratamentos em relação ao controle (teste de Dunnett-t;  $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 3 – Resposta das formigas casta forrageira de *Atta opaciceps* submetidas extratos de glândulas de veneno de castas coespecíficas.**

Casta (Extrato)	Numero de arcos seguidos por forrageiras expostas por um período de 10 min (Média ± D.P.)
Hexano (controle)	0.0 ± 0.0 aA
Jardineiras	116.75 ± 35.13 bC
Generalistas	115.00 ± 17.68 bC
Forageiras	392.25 ± 71.75 bD
Soldados	73.75 ± 3.72 bB

Fonte: Autor, 2011.

Nota: Em uma mesma coluna, letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre médias (teste de Tukey-HSD,  $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa dos tratamentos em relação ao controle (teste de Dunnett-t;  $p \leq 0,05$ ).

### 2.3.2 Avaliação da Resposta de Forrageiras de *A. Opaciceps* diante de Extratos Inter-Específicos de *A. Sexdens Sexdens*, *A. Sexdens Rubropilosa*, *A. Cephalotes* E *Acromyrmex Subterraneus Subterraneus*

Extratos obtidos das glândulas de veneno de forrageiras de diferentes espécies de formigas cortadeiras eliciaram diferentes respostas em forrageiras de *A. opaciceps* (Tabela 4). Os resultados indicaram que, estatisticamente, existe similaridade ( $p \geq 0,05$ ) de resposta desta espécie em relação ao extrato de glândulas de veneno de forrageiras de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Por outro lado, apesar de forrageiras de *A. opaciceps* seguirem a trilha do extrato de glândulas de veneno de *A. cephalotes*, *A. sexdens sexdens* e *A. sexdens rubropilosa*, a mesma diferiu significativamente para estas espécies ( $p < 0,05$ ). O tratamento controle (hexano) não eliciou resposta em nenhum dos bioensaios realizados ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabela 4 – Respostas das formigas casta forrageira da espécie *Atta opaciceps* submetidas extratos de glândulas de veneno de diferentes espécies de formigas cortadeiras.**

Espécies (extratos)	Numero de arcos seguidos por forrageiras de <i>A. opaciceps</i> expostas aos extratos por um período de 10 min (Média $\pm$ D.P.)
Hexano (controle)	0.00 $\pm$ 0.0 aA
<i>A. opaciceps</i>	260.00 $\pm$ 44,3 bC
<i>A. cephalotes</i>	155.00 $\pm$ 27,8 bB
<i>A. sexdens sexdens</i>	10.00 $\pm$ 12,7 bA
<i>A. sexdens rubropilosa</i>	10.00 $\pm$ 12,7 bA
<i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i>	226.00 $\pm$ 24,6 bC

Fonte: Autor, 2011.

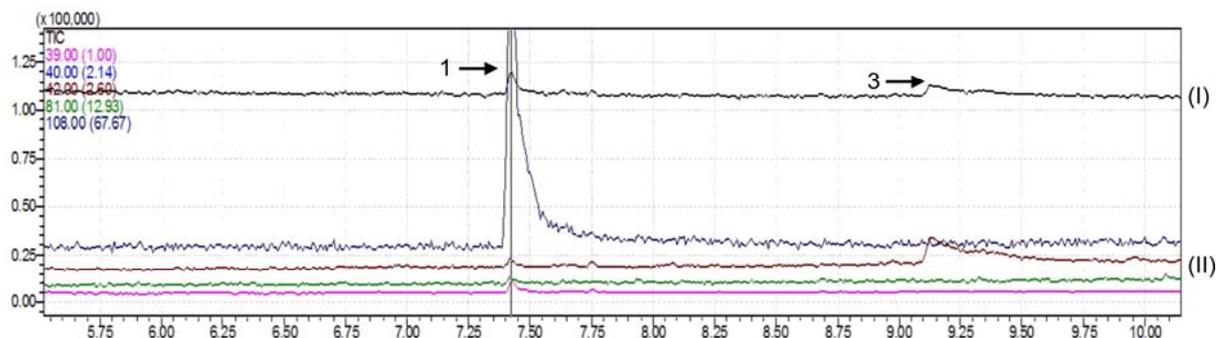
Nota: Em uma mesma coluna, letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre médias (teste de Tukey-HSD,  $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa dos tratamentos em relação ao controle (teste de Dunnett-t,  $p \leq 0,05$ ).

### 2.3.3 Análises Químicas dos Extratos Hexânicos de Glândulas de Veneno de *A. Opaciceps*

Análises químicas dos extratos hexânicos de glândulas de veneno de forrageiras de *A. opaciceps* (4 glândulas/100 $\mu$ L) por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) empregando a técnica de varredura SCAN apresentaram baixo limite de detecção para os constituintes químicos presentes nestes extratos. Deste modo, optou-se pelo emprego da técnica de varredura SIM, através da qual os íons listados na Tabela 4 foram escaneados e monitorados.

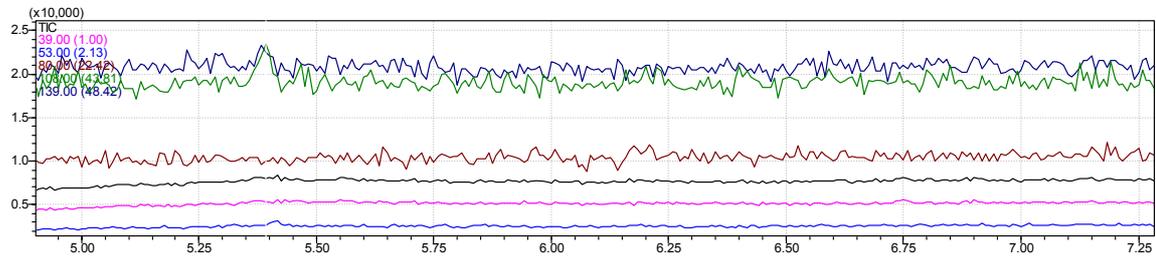
Os resultados apresentados na Figura 3 (A, B e C) demonstraram que apenas três compostos nitrogenados: a 2,5-dimetilpirazina (DMP, Figura 3A), o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (M4MPC, Figura 3B) e o 3-etil-2,5-dimetilpirazina (EDMP, Figura 3C) e, nas concentrações relativas de 0,11 ng, menos que 0,1 ng (traço) e 7,84 ng respectivamente, estavam presentes nas amostras de extratos de glândulas de veneno de forrageiras de *A. opaciceps*, cujos espectros de massa são apresentados na Figura 4.

**Figura 3A – (I) Cromatograma representativo do extrato da glândula de veneno de forrageira de *Atta opaciceps*, apresentando 1=2,5-dimetilpirazina (DMP) e 3= 3-etil-2,5-dimetilpirazina (EDMP). (II) Fragmentograma característico para o composto1 (Figura 4A).**



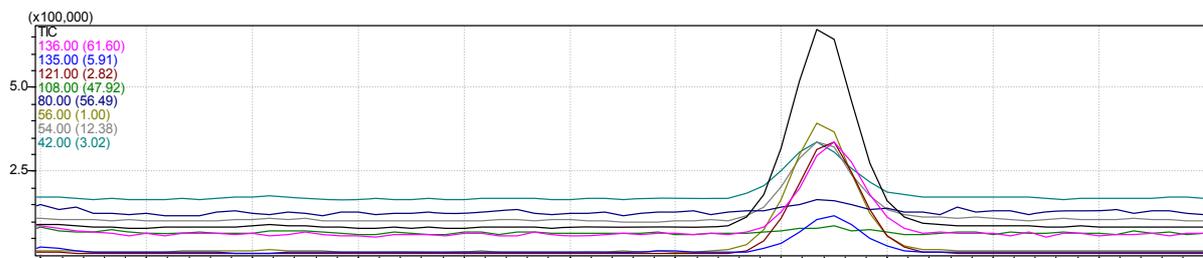
Fonte: Autor, 2011.

**Figura 3B – Fragmentograma da 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (M4MPC, Figura 4B) (modo SIM=m/z 139) para a espécie *Atta opaciceps*.**



Fonte: Autor, 2011.

**Figura 3C – Fragmentograma da 3-etil-2,5-dimetilpirazina (EDMP, Figura 4C) (modo SIM=m/z 136) para a espécie *Atta opaciceps*.**

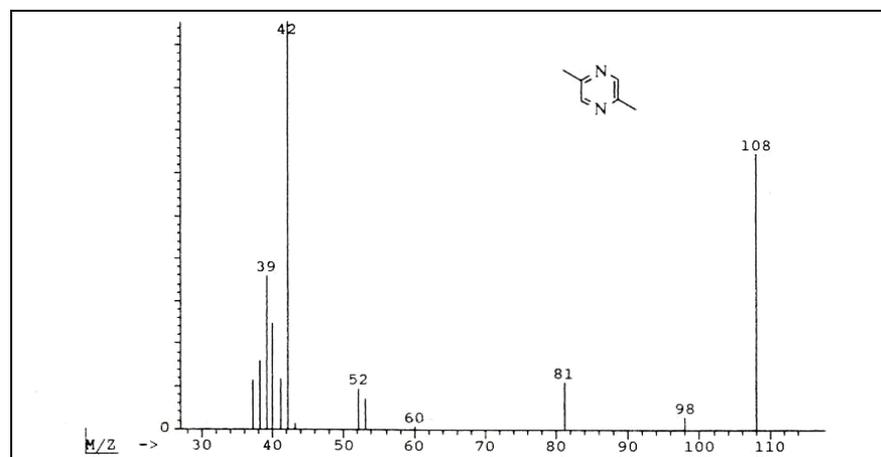


Fonte: Autor, 2011.

**Figura 4 – Espectros de massa dos compostos pelo método de varredura SIM, onde cada letra corresponde a: A: 2,5-dimetilpirazina (DMP); B: 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (M4MPC) e C: 3-etil-2,5-dimetilpirazina (EDMP).**

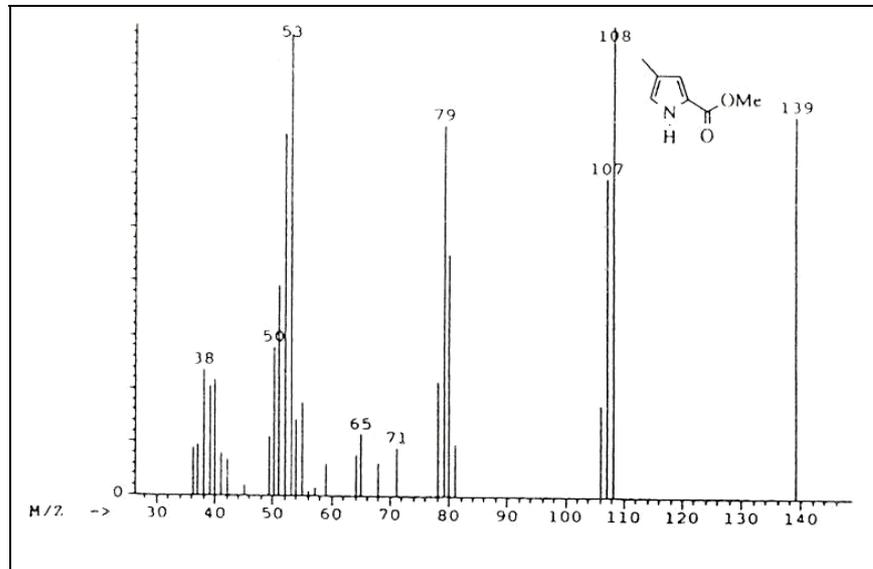
(Continua)

(A)

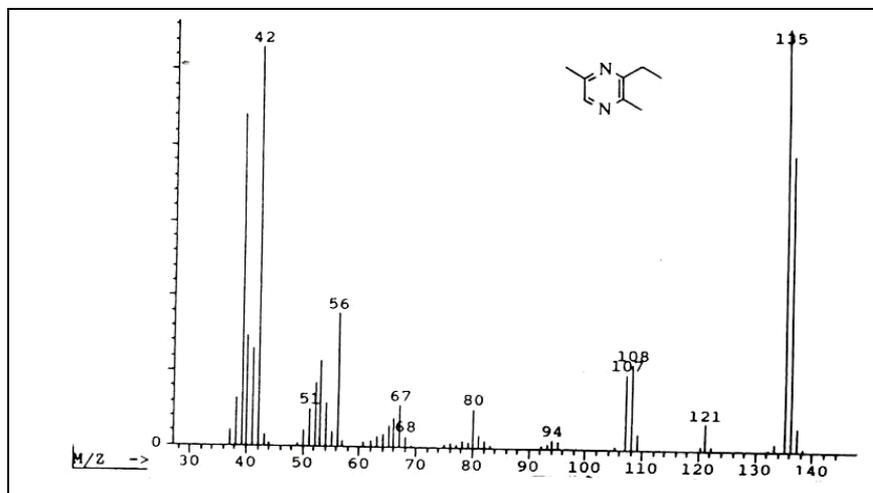


(Continuação)

(B)



(C)

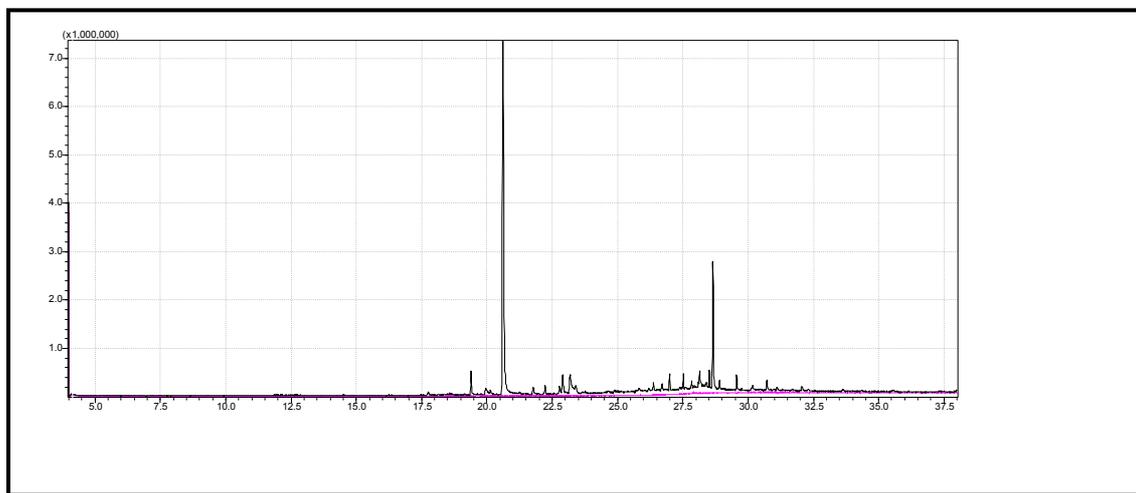


Fonte: Autor, 2011.

Além destes, outros compostos foram encontrados nestes extratos pelo emprego do método de varredura SCAN, os quais estão presentes nos extratos em maiores proporções, como pode ser visto na Figura 5. Estes compostos foram identificados como hidrocarbonetos de cadeia linear e compostos oxigenados, tais como: cetonas e ésteres metílicos. Os ftalatos (contaminantes oriundos de película Parafilm<sup>®</sup> empregada para selar previamente as ampolas de vidro contendo os

extratos das glândulas de veneno de forrageiras de *A. opaciceps* também foram detectados nos extratos destas glândulas. Com exceção dos ftalatos, os demais compostos encontrados no cromatograma possivelmente são oriundos da secreção da glândula de Dufour, os quais foram possivelmente transferidos para a superfície da glândula de veneno durante o processo de dissecação desta glândula, sendo considerados, portanto, como contaminantes.

**Figura 5 – Cromatograma total de íons obtido pela técnica de varredura SCAN para o extrato da glândula de veneno de *Atta opaciceps* (linha rosa corresponde à corrida do branco). O pico de maior abundância no cromatograma corresponde ao contaminante ftalato.**



Fonte: Autor, 2011.

## 2.4 Discussão

O comportamento de seguimento de trilha de formigas da casta forrageira de *A. opaciceps* foi semelhante ao descrito para as espécies de formigas do gênero *Atta* já estudadas (RILEY et al., 1974; CROSS et al., 1982; EVERSLED; MORGAN, 1983; BILLEN; BEECKMAN; MORGAN, 1992; BILLEN; MORGAN, 1998; MORGAN et al.; 2006; FRANCELINO et al., 2006, 2008). Por possuir papel fundamental de busca de alimento, a casta forrageira exerce papel norteador das demais. Além disso, existe diferença na utilização de trilha por operárias coletoras e não coletoras de folhas, elas utilizam primeiramente a trilha química e, em seguida, diferenças no odor ao longo da trilha (MORGAN et al., 2006). Nesse sentido, Schoeters e Billen

(1990), encontraram diferenças na estrutura da parte secretória da glândula de veneno em diferentes castas.

A menor capacidade apresentada pela casta dos soldados em eliciar o comportamento de trilha pode ser explicada pelo fato de que a principal função exercida por esta casta é a defesa do formigueiro contra os inimigos naturais. De maneira análoga, a inércia apresentada pelas formigas da casta jardineira em responder ao recrutamento para trilha, deve-se ao fato de que as atividades desta casta estarem restritas ao interior do formigueiro, visto que, elas cultivam e cuidam do jardim de fungos para alimentar o conjunto do formigueiro. Estes resultados estão coerentes com o que afirmou Mariconi (1970) para os papéis das castas de *A. capiguara*.

Quando as forrageiras de *A. opaciceps* foram submetidas a extratos de castas de forrageiras pertencentes à espécie *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *A. cephalotes*, *A. sexdens sexdens* e *A. sexdens rubropilosa*, observou-se diferentes intensidades de respostas aos comportamentos de trilha eliciados pelos extratos de glândulas de veneno de forrageiras destas espécies. Uma explicação para estes resultados encontra-se na diferença de composição química dos feromônios de trilha de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *A. cephalotes*, *A. sexdens sexdens* e *A. sexdens rubropilosa*. Na secreção da glândula de veneno de forrageiras de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, Do Nascimento et al., (1994) identificaram o éster 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (M4MPC), na proporção de 1.2 ng/formiga, como o feromônio de trilha desta espécie e, em bioensaios de trilha conduzidos em laboratório, demonstraram a atividade deste composto em eliciar o comportamento de trilha em forrageiras desta espécie. Além disso, estes autores observaram que, as alquilpirazinas 2,5-dimetilpirazina (DMP), 2,3,5-trimetilpirazina (TMP) e 3-etil-2,5-dimetilpirazina (EDMP), não potencializaram a resposta de recrutamento para trilha quando foram misturadas ao M4MPC, em diferentes proporções e combinações.

A composição química do feromônio de trilha em *Atta* spp. está bem determinada como sendo basicamente composta de 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (M4MPC) ou 3-etil-2,5-dimetilpirazina (EDMP) (TUMLINSON et al., 1971; RILEY et al., 1974; CROSS et al., 1979; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990;

EVERSHED; MORGAN, 1983; DO NASCIMENTO et al., 1994; MORGAN et al., 2006). As diferenças entre espécies ocorrem somente a níveis proporcionais. Para as espécies *A. cephalotes* e *A. texana*, por exemplo, a substância M4MPC foi identificada como o feromônio de trilha (RILEY et al., 1974; TUMLINSON et al., 1971, 1972). No entanto, para a espécie *A. sexdens rubropilosa*, o composto EDMP foi identificado como eliciador de recrutamento para trilha (CROSS et al., 1979) e uma mistura das substâncias EDMP e M4MPC na proporção de 14:1 foi identificada como responsável pelo comportamento de trilha de forrageiras desta espécie.

Os resultados obtidos nos bioensaios demonstraram que forrageiras de *A. opaciceps* não discriminam os extratos de glândulas de veneno de forrageiras de sua espécie e de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Por sua vez, existe uma diferença significativa na resposta de *A. opaciceps* frente ao extrato de *A. cephalotes*, *A. sexdens sexdens* e *A. sexdens rubropilosa*. Isto sugere a possibilidade de semelhança na composição química do feromônio de trilha destas duas espécies (*A. opaciceps* e *A. subterraneus subterraneus*) de modo que, uma vez confirmadas, estas informações podem contribuir para uma estratégia de controle efetiva para ambas.

Deste modo, os resultados das análises químicas dos extratos das glândulas de veneno de forrageiras de *A. opaciceps* demonstraram que uma mistura de três compostos nitrogenados: DMP, EDMP e M4MPC estão presentes na secreção desta glândula, os quais já foram reportados como componentes dos feromônios de trilha de várias espécies de formigas cortadeiras (TUMLINSON et al., 1971; RILEY et al., 1974; CROSS et al., 1979; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; EVERSHED; MORGAN, 1983; DO NASCIMENTO et al., 1994; MORGAN et al., 2006). Entretanto, a evidência de que a resposta comportamental exibida por forrageiras de *A. opaciceps* frente ao extrato de forrageiras de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* é semelhante ao comportamento apresentado diante do extratos de forrageiras da mesma espécie, aponta a substância M4MPC como o feromônio de trilha de *A. opaciceps*. Assim, a síntese deste composto se faz necessária para que, em bioensaios subseqüentes a sua atividade biológica como eliciador de comportamento de trilha em *A. opaciceps* possa ser totalmente comprovada, inclusive com relação as concentrações efetivas deste composto.

As informações contidas neste estudo contribuem para elucidar o complexo mecanismo de comunicação de trilha existente entre espécies de formigas cortadeiras em relação às diferenças existentes entre castas e entre espécies, principalmente no que diz respeito à *A. opaciceps*, para a qual existem estudos relacionados somente ao comportamento de alarme (FRANCELINO et al., 2006, 2008).

## 2.5 Conclusões

1. A casta forrageira da espécie *A. opaciceps* é a responsável pelo eliciamento do comportamento de trilha das demais castas e possui a propriedade de perceber de maneira mais eficiente o seu próprio feromônio de trilha;
2. Forrageiras de *A. opaciceps* são capazes de distinguir seu feromônio em relação àquele de forrageiras inter-específicas, especialmente de *A. sexdens sexdens*;
3. Forrageiras de *A. opaciceps* respondem de modo similar a extratos de sua espécie como também para as forrageiras *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, sugerindo similaridade de composição entre as mesmas em relação ao feromônio de trilha;
4. O feromônio de trilha de *A. opaciceps* possui compostos nitrogenados em sua composição, dentre os quais, o M4MPC, identificado como feromônio de trilha de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*.

## REFERÊNCIAS

BESHERS, S. N.; FEWELL, J. H. Models of division of labor in social insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 46, p. 413-440, 2001. ISSN 0066-4170.

BILLEN, J.; MORGAN, E. D. Pheromone communication in social insects: sources and secretions. In: MEER, R. K. V. et al. **Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees and termites**. Boulder: Westview Press, 1998. v. 1, p. 3-33.

\_\_\_\_\_; BEECKMAN, W.; \_\_\_\_\_. Active trail pheromone compounds and trail following in the ant *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). **Ethology, Ecology and Evolution**, London, v. 4, p. 197-202, 1992. ISSN: 0394-9370.

CROSS, J. H. et al. The major component of the trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae: Myrmicinae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 8, n. 8, p. 1119-1124, 1979. ISSN 0098-033.

\_\_\_\_\_. et al. Trail pheromone of leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae: Myrmicinae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 8, p. 1119-1124, 1982. ISSN 0098-033.

DO NASCIMENTO, R. R. et al. Trail pheromone of leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus* (Forel). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 1719-1724. 1994. ISSN 0098-033.

EVERSHED, R. P.; MORGAN, E. D. The amounts of trail pheromone substance in the venon of workers of four species of attine ants. **Insect Biochemistry**. Bristol, v. 13, p. 469-474, 1983. ISSN 0020-1790.

FRANCELINO, M. R. V. **Estudos químico e etológico da secreção das glândulas mandibulares de duas espécies de formigas cortadeiras do gênero *Atta*, *Atta sexdens sexdens* e *Atta opaciceps***: provável função como feromônio de alarme e reconhecimento intraespecífico. 2004. 58 f. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2004.

FRANCELINO, M. R. V. et al. The mandibular gland secretions of the leaf-cutting ants *Atta sexdens sexdens* and *Atta opaciceps* exhibit intercaste and intercolony variations. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, n. 3, p. 646-655, 2006. ISSN 0098-033.

\_\_\_\_\_. et al. Polyethism and nestmate recognition in the alarm reaction of *Atta* leaf-cutting ants. **Physiological Entomology**, London, v. 33, p. 37-42, 2008. ISSN 0307-6962.

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

HUGHES, W. H. O.; BOOMSMA, J. J. Genetic polymorphism in leaf-cutting ants is phenotypically plastic. **Proceedings Royal Society London B: Biology Science**, London, v. 274, p. 1625-1630, 2007. ISSN 0962-8452.

\_\_\_\_\_; GOULSON, D. Polyethism and the importance of context in the alarm reaction of the grass-cutting ant. *Atta capiguara*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 49, p. 503-508, 2001. ISSN 0340-5443.

\_\_\_\_\_. et al. Worker caste polymorphism has a genetic basis in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Proceedings Natural Academic Science USA**, Washington, v. 100, p. 9394-9397, 2003. ISSN 0369-8203.

JAFFÉ, R. et al. Worker caste determination in the army ant *Eciton burchelli*. **Biological Letters**, v. 3, p. 513-516, 2007. ISSN: 1744-957X.

KLEINEIDAM, W. O. H. et al. A macroglomerulus in the antennal lobe of leaf-cutting ant workers and its possible functional significance. **Chemical Senses**, Oxford, v. 30, p. 383-392, 2005. ISSN 0379-864X.

MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970.

MORGAN, E. D. et al. Preferences and differences in the trail pheromone of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera:Formicidae). **European Journal of Entomology**, Ceske Budejovice, v. 22, p. 408-413, 2006. ISSN 1210-5759.

OLDROYD, B. P.; FEWEL, J. H. Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. **Trends Ecology and Evolution**, v. 22, p. 408-413, 2007. ISSN 0169-5347.

RILEY, R. G. et al. Methyl 4-methylpyrrole-2-carboxylate, a volatile trail pheromone from the leaf cutting ant *Atta cephalotes*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 20, p. 651-654, 1974. ISSN 0022-1910.

SCHOETERS, E.; BILLEN, J. Morphology of the venon gland in relation to worker size in leaf-cutting ants. **Actes Colloq Insects Socials**, v. 6, p. 249-252, 1990. ISSN 0165-0424.

SUDD, J. H. **An introduction to the behaviour of ants**. London: E. Arnold, 1967.

TUMLINSON, J. H. et al. Identification of the trail pheromone of a leaf cutting ant *Atta texana*. **Nature**, London, v. 234, p. 348-349, 1971. ISSN 0028-0836.

\_\_\_\_\_. et al. A volatile trail pheromone of the leaf-cutting ant. *Atta texana*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 18, p. 809-814, 1972. ISSN 0022-1910.

WADDINGTON, S. J. et al. Genetic polyethism in leaf-cutting ants. **Behavioral Ecology**, New York, v. 128, p. 1-5, 2010. ISSN 1045-2249.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: *Atta*): IV colony ontogeny of *A. cephalotes*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 14, p. 55-60, 1983. ISSN 0340-5443.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*): I. the overall pattern in *Atta sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 7, p. 143-156, 1980. ISSN 0340-5443.

\_\_\_\_\_. Causes of ecological success: the case of the ants. **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 56, p. 1-9, 1987. ISSN 0021-8790.

\_\_\_\_\_. **The insect societies**. Cambridge: Harvard University Press, 1971.

**CAPITULO 3 – POLIETISMO E RECONHECIMENTO INTRA-ESPECÍFICO  
DO FEROMÔNIO DE MARCAÇÃO DE TERRITÓRIO DE  
*Atta opaciceps***

## RESUMO

A comunicação química é um dos principais meios de comunicação utilizados pelos insetos sociais, tais como as formigas cortadeiras, as quais possuem uma complexa divisão morfológica subdividida em castas. Neste contexto, o comportamento de marcação de território de *Atta opaciceps* foi investigado, sob condições de laboratório, a fim de elucidar a relação entre o mesmo e as diferentes castas desta espécie. Formigas foram coletadas em ninhos existentes no campus A.C. Simões, da Universidade Federal de Alagoas e os extratos preparados a partir da dissecação da região abdominal, com retirada da glândula de Dufour seguida de maceração da mesma em hexano (10 glândulas/100 $\mu$ L). Os bioensaios foram realizados sob condições de laboratório (24 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C e 70 $\pm$ 10% U.R.) em arena de vidro (14,8cm x 30cm x 30cm), onde 5 formigas foram liberadas e observadas durante 10 minutos com 10 repetições/bioensaio. Os mesmos foram divididos da seguinte forma: i) quatro castas de formigas de *A. opaciceps* foram submetidas ao extrato da casta forrageira; ii) formigas de *A. opaciceps* pertencentes à casta forrageira foram submetidas a extratos de mesma e de outras castas. As variáveis analisadas foram as seguintes: toque na fonte de odor e toque entre si e as médias obtidas foram analisadas por testes paramétricos e não-paramétricos, sendo utilizado o testes de Levene e Lilliefors para verificação da homogeneidade e normalidade, respectivamente. As comparações das médias foram feitas por ANOVA, seguida pelos testes de Kruskal Wallis, Dunnet C e Dunnet T e pelo teste de Tukey HSD (p<0.05). Os resultados demonstraram que extratos da casta forrageira eliciaram respostas comportamentais significativas em relação às demais castas. Além disso, observou-se que o extrato de todas as castas pode eliciar comportamento na casta forrageira, com a resposta para extratos de operárias de sua própria casta diferindo das demais. Pode-se concluir, portanto, que em *Atta opaciceps* a casta forrageira é a responsável pelo eliciamento de respostas de marcação de território nas demais castas detectando de maneira mais eficiente, o seu próprio feromônio.

**Palavras-chave:** Formigas cortadeiras. Feromônio de marcação de território. Polietismo.

## ABSTRACT

The territorial behaviour of the various castes of ants *Atta opaciceps*, was investigated under laboratory conditions. The ants were collected in the field nests and the extracts were prepared from the abdominal dissection, removing the Dufour gland followed by soaking in hexane. The tests were divided into two experiments: first, four varieties of ants in *A. opaciceps* extracts were subjected to foragers caste. In the second experiment, ants of *A. opaciceps* to the forager caste extracts were subjected to the same and other castes. In the first experiment, extracts of foragers elicited significant behavioral responses when compared with other castes. In the second, we observed that the extract of all castes can elicit behavior of foragers, with the response to extracts of their own caste of differing from the others. The results suggest that forager of *A. opaciceps* are responsible for eliciting territorial behaviour in the other castes and detected more efficiently, its own pheromone.

**Key-Words:** Leaf-cutting ants. Territorial marking pheromone. Polietism.

### **3.1 Importância das Formigas Cortadeiras**

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* (saúvas) são consideradas herbívoros altamente generalistas, atacando uma grande variedade de espécies de plantas de diversas famílias (CHERRETT; POWELL; STRADLING, 1989), coletando mais vegetação do que qualquer outro grupo de herbívoros dominantes nas florestas tropicais (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Existem há 50 milhões de anos no continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina (MARICONI, 1970; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). A dominância deste gênero resulta da interação metabólica com fungos simbiotes, estabelecida durante milhões de anos de co-evolução. (BASS; CHERRET, 1995; NORTH; JACKSON; HOWSE, 1997).

### **3.2 Polietismo e a Divisão Social do Trabalho**

Dentro da sociedade das formigas existe uma evidente diferenciação de comportamentos quanto à divisão do trabalho, fenômeno este denominado de polietismo (SUDD, 1967). Deve-se entender também outro fenômeno adjacente, o aloetismo, que é um fenômeno comparável das respostas comportamentais, no qual a probabilidade de desempenho de uma tarefa específica existe em função do tamanho do corpo da operária. O aloetismo se intensifica quando as operárias estão envolvidas no forrageamento e processamento vegetal para a obtenção e geração de recursos alimentares (WILSON, 1980, 1983).

Operárias de *Atta* exibem uma variação em massa a qual é uma das mais conhecidas em formigas e as mesmas segundo Wilson (1980) são classificadas em castas menores, médias, maiores e soldados dependendo do tamanho da cápsula cefálica. Estes aspectos morfológicos são considerados uma adaptação que facilita sua distribuição e divisão de trabalho (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

### **3.3 Feromônio de Marcação de Território**

A comunicação química é um dos principais meios de comunicação utilizados pelos insetos sociais. Dentre os sinais químicos empregados por eles encontram-se

os feromônios de marcação de território, que são amplamente utilizados entre as formigas cortadeiras, às quais marcam e reconhecem seu próprio território garantindo à colônia o alimento e a defesa (SALZEMAN et al., 1992).

O comportamento de marcação de território de formigas cortadeiras é parte de um complexo sistema de defesa de recursos alimentares e do ninho. (WHITEHOUSE; JAFFÉ, 1996). O processamento da informação referente ao estímulo de odor pelas operárias está relacionado à sua neuroanatomia e isto provavelmente resulta em diferentes comportamentos guiados pelo olfato (KLEINEIDAM et al., 2005). Do ponto de vista genotípico, as operárias diferem em sua propensão para se engajar em uma tarefa particular (WADDINGTON et al., 2010). Fenotípicamente, a evidência morfológica de efeito genético tem sido encontrada em diversas formigas com indivíduos diferindo de acordo com a sua função dentro da colônia (HUGHES et al., 2003; JAFFÉ et al., 2007; WADDINGTON et al., 2010).

Formigas que encontram um substrato avançam pouco a pouco encostando seu gáster (porção terminal do abdômen) no mesmo em um comportamento considerado como marcação de território. Em territórios virgens, a operária que explora a área pela primeira vez, demonstra uma pequena, porém significativa vantagem sobre operárias de outras espécies. Esta vantagem é mantida somente se a formiga retornar ao ninho marcando o território. Um intruso sobre um território marcado adota características submissas de postura quando encontra uma operária residente, demonstrando a existência de um efeito intimidante (SALZEMAN; JAFFÉ, 1990).

O valor adaptativo do feromônio de marcação de território em formigas cortadeiras foi investigado através do estudo de *Atta laevigata* em plantações de eucalipto. Operárias secretaram um feromônio colônia-específico em torno dos seus ninhos e ao longo das suas trilhas-tronco. O reconhecimento de território dependia simultaneamente de estímulos visuais e químicos, que levavam as operárias a se orientarem em direção ao ninho do qual elas saíram. Os autores sugeriram uma dupla função do feromônio de marcação de território: repelência de intrusos provenientes de outras colônias e orientação de operárias para localização de seus ninhos (SALZEMAN; JAFFÉ, 1990).

Estudos etológicos realizados com *A. laevigata* evidenciaram a participação das secreções da glândula de Dufour na marcação de território (SALZEMAN et al., 1992). Os principais componentes produzidos por essa glândula são alcenos e alcanos (VILELA; DELLA LÚCIA, 1993). Quatro compostos foram relatados como componentes do feromônio de marcação de território de formigas cortadeiras: (Z)-9-tricoseno, (Z)-9-nonadeceno, 8,11-nonadecadieno e n-heptadecano (EVERSHED; MORGAN, 1981).

### **3.4 Objetivos Específicos**

1. Esclarecer o comportamento de *A. opaciceps* quanto à especificidade do comportamento de marcação de território verificando como as diversas castas respondem a diferentes extratos intra-específicos sob condições de laboratório.
2. Conhecer a casta responsável pelo eliciamento do comportamento de marcação de território em diferentes castas de *A. opaciceps*.
3. Identificar a casta responsável pelo reconhecimento do feromônio de marcação de território entre as castas de *A. opaciceps*.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Coleta de Insetos**

As formigas de *Atta opaciceps*, foram coletadas em ninhos localizados no Campus Aristóteles Calazans Simões da Universidade Federal de Alagoas, sempre no mesmo horário entre 08 e 10 horas.

Durante o experimento, os ninhos selecionados foram protegidos da aplicação de iscas tóxicas, presença de coivaras (fogo), escavações no entorno, dentre outras perturbações. Assim, as formigas foram coletadas, com auxílio de pinças entomológicas limpas, tanto na entrada do ninho como também nas suas trilhas de forrageamento, de maneira cuidadosa, evitando assim a liberação excessiva de compostos voláteis pelas mesmas.

Em seguida, os espécimes foram acondicionados em caixa de acrílico (20 cm altura x 50 cm comprimento x 30 cm largura) forrada com folhagem. Posteriormente, foram levadas ao laboratório para serem imediatamente empregados na preparação dos extratos e nos bioensaios.

### **4.2 Identificação da Espécie**

A identificação da espécie de formiga cortadeira *Atta opaciceps* foi realizada pelo Dr. Jacques H. C. Delabie do Laboratório de Mirmecologia - CEPEC/CEPLAC - Itabuna-Bahia, o qual utilizando-se de caracteres morfológicos tais como: estrutura da cápsula cefálica, coloração e pêlos do gáster, espinhos e lobos occipitais (FRANCELINO et al.,2006).

### **4.3 Preparação dos Extratos**

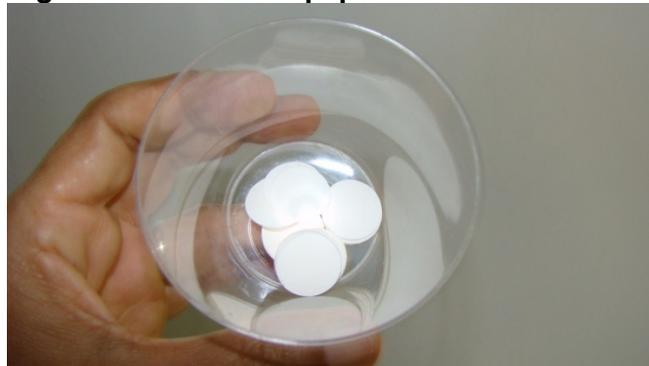
A região abdominal de formigas foi dissecada, com auxílio de pinças, sob microscópio estereoscópio (Wild Leica M3B). Após a extração da glândula de Dufour, os extratos foram obtidos através da maceração das mesmas em hexano HPLC. Foram utilizadas 10 glândulas de Dufour para cada 100 µL de hexano HPLC.

Os extratos preparados foram acondicionados em ampolas de 2 mL, sendo seladas e etiquetadas e colocados em freezer a temperatura constante de - 4° C.

#### 4.4 Preparação dos Discos de Papel de Filtro

Os discos de papel de filtro (Watman® n°01) (Figura 1) com peso equivalente a  $30\pm 4\text{mg/cm}^2$  de 20 mm de diâmetro foram confeccionados e esterilizados em autoclave por 15 minutos, a 121° C. A capacidade de saturação em cada disco com amostras foi de 20 $\mu\text{L}$ .

**Figura 1 – Discos de papel de filtro**



Fonte: Autor, 2010.

#### 4.5 Bioensaios

Todos os bioensaios foram realizados em uma sala climatizada com temperatura média de  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $70\pm 10\%$  de umidade relativa do ar, localizada no Laboratório de Ecologia Química, do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas, entre 10 e 11 horas da manhã no período de janeiro a abril de 2010. Durante os bioensaios foi utilizada uma lâmpada vermelha de 15 W para facilitar as observações, uma vez que os insetos, tais como as formigas não são capazes de enxergar nesse comprimento de onda e deste modo não foram influenciados pela luz.

**Figura 2 – Arena de vidro.**



Fonte: Autor, 2010.

As observações ocorreram em arena (14,8 cm x 30 cm x 30 cm) (Figura 2), contendo no seu interior, um disco de papel de filtro (20mm $\varnothing$ ) impregnado com 10 $\mu$ L (1IE) de cada extrato (tratamento). O início de um bioensaio ocorria após a liberação de 5 formigas na arena, onde permaneciam durante 10 minutos. Logo após esse tempo, as formigas eram retiradas, bem como o papel de filtro. A arena era limpa com algodão embebido com água destilada, e uma nova repetição se iniciava. A quantificação das respostas foi feita através da observação do número de vezes que as formigas exibiam comportamentos característicos de marcação de território, ou seja, toque entre si (Figura 3) e marcação da fonte de odor com inclinação de abdômen e toque no disco de papel de filtro com a extremidade final do gáster (Figuras 4 e 5).

**Figura 3 – Comportamento de toque entre duas formigas da espécie *Atta opaciceps* da casta forrageira durante o bioensaio no laboratório.**



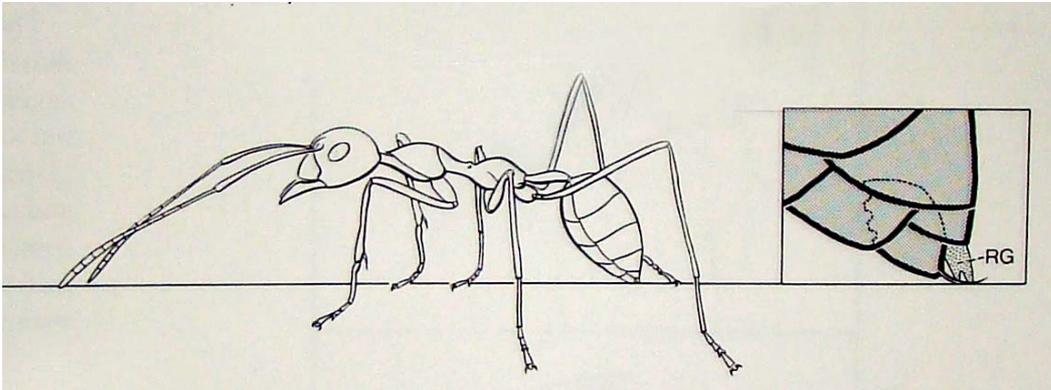
Fonte: Autor, 2010.

**Figura 4 – Marcação da fonte de odor (papel de filtro impregnado com extrato) inclinação de abdômen e com a extremidade final do gáster de uma formiga da espécie *Atta opaciceps* da casta forrageira durante bioensaio.**



Fonte: Autor, 2010.

**Figura 5 – Desenho esquemático da formiga da espécie *Oecophylla longinoda* tocando o terminal do gáster sobre a superfície**



Fonte: Hölldobler; Wilson, 1990.

## 5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Os bioensaios foram realizados em duas etapas: na primeira, formigas da casta forrageira foram submetidas a extratos das diferentes castas, inclusive a própria e na segunda, formigas de todas as castas foram submetidas ao extrato de forrageiras. Além disso, foram testadas formigas com disco impregnado com hexano (tratamento-controle) e com o disco limpo (tratamento-testemunha). As variáveis analisadas foram os comportamentos de marcação da fonte de odor (papel) e toque de formigas entre si.

Foram observados os pressupostos paramétricos quanto à homogeneidade das variâncias dos resíduos ( $p \geq 0,05$ ) pelo teste de Levene e à normalidade dos mesmos pelo teste de Lilliefors ( $p \geq 0,05$ ). Os dados foram analisados utilizando-se os testes paramétricos F de Snedecor, Dunnett-t, Dunnett-C, Tukey-HSD e o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Sendo que a segunda etapa obedeceu a um esquema fatorial 3x4 (3 tratamentos: extrato de forrageira, controle e branco e 4 castas: jardineiras, generalistas, forrageiras, soldados), perfazendo 12 tratamentos, com 10 repetições para cada tratamento, sendo a parcela constituída por 5 formigas.

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Descrição do Comportamento de Marcação de Território de *A. opaciceps***

A introdução do papel de filtro impregnado com extratos coespecíficos alterou significativamente o comportamento das diferentes castas de formigas de *A. opaciceps* que passaram a caminhar na arena. Durante os bioensaios ocorreu um aumento de movimentação e toques nas paredes da arena. Alguns comportamentos foram repetidos com frequência, como toque de formigas entre si e marcação da fonte de odor, enquanto que outros tipos de comportamento, tais como a antenação de formigas ao redor da fonte aparente do odor, aglomeração e inclinação de abdômen também foram observados, porém, esporadicamente.

### **6.2 Avaliação do Comportamento de Marcação de Território de Forrageiras de *A. opaciceps***

Observou-se que a resposta da casta forrageira para o comportamento de marcação na fonte de odor e toque entre si, foi altamente significativa ( $p < 0,01$ ) e não-significativa ( $p \geq 0,05$ ), respectivamente. De acordo com a Tabela 1, a análise comparativa do comportamento de toque entre si mostrou que não houve diferença ( $p \geq 0,05$ ) na resposta da casta forrageira para as demais castas. Além disso, observou-se que não houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) de resposta em relação ao tratamento controle.

**Tabela 1 – Respostas médias de marcação de território (comportamento de toque entre si) de forrageiras de *Atta opaciceps* para diferentes castas, ao tratamento controle (hexano) e a testemunha (branco)**

<b>Tratamentos (Extratos)</b>	<b>Toque entre si* (Média±DP)</b>
Hexano puro	24,2±1,46 aA
Jardineira	25,4±2,54 aA
Generalista	24,6±3,54 aA
Forageira	31,4±1,69 aA
Soldado	26,2±2,47 aA
Branco	23,4±1,16 aA

Fonte: Autor, 2011.

Nota:\*Letras minúsculas e maiúsculas nas colunas indicam, respectivamente, diferença significativa através do teste de Tukey-HSD ( $P < 0,05$ ) e em relação ao controle pelo teste de Dunnett-t ( $P < 0,05$ ).

A Tabela 2 mostra a análise comparativa, do comportamento de marcação na fonte de odor, demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) da resposta de forrageiras, com melhor resposta para o extrato de sua própria casta em relação aos demais tratamentos e ao controle ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2 – Respostas médias de marcação de território (comportamento de toque na fonte de odor) de forrageiras de *Atta opaciceps* para diferentes castas, ao tratamento controle (hexano) e a testemunha (branco)**

<b>Tratamentos (Extratos)</b>	<b>Toque na fonte* (Média±DP)</b>
Hexano puro	0,0±0,0 aA
Jardineira	0,0±0,0 aA
Generalista	0,8±0,48 aA
Forrageira	4,8±1,74 bB
Soldado	0,0±0,0 aA
Branco	0,0±0,0 aA

Fonte: Autor, 2011.

Nota: \*Letras minúsculas e maiúsculas nas colunas indicam, respectivamente, diferença significativa através do teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ) e em relação ao controle pelo teste de Dunnett-C ( $P < 0,05$ ).

### **6.3 Avaliação do Comportamento de Marcação de Território de Diferentes Castas de *A. opaciceps***

A resposta das castas apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de modo que, como mostra a Tabela 3, para o comportamento de toque entre si as formigas forrageiras apresentaram melhor resposta diante do extrato proveniente de sua própria casta ( $p < 0,05$ ) e em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). De modo geral, as demais respostas foram variáveis em relação à significância estatística.

**Tabela 3 – Valores de marcação de território (comportamento de toque entre si) de formigas de *Atta opaciceps* de diferentes castas (casta 1: Jardineiras, casta 2: generalistas, casta 3: forrageiras, casta 4: soldados) submetidas ao extrato de forrageiras (tratamento 1), ao hexano (tratamento 2-controle) e ao disco limpo (tratamento 3-testemunha)**

Fatores	Variáveis
Tratamento x Casta	(Média±DP)
	Toque entre si <sup>1</sup>
(forrageiras x jardineiras)	16,6 ± 1,8 cB
(forrageiras x generalistas)	17,0 ± 1,1 cB
(forrageiras x forrageiras)	31,4 ± 1,7 aB
(forrageiras x soldados)	6,6 ± 1,7 eB
(hexano x jardineiras)	24,2 ± 1,5 bA
(hexano x generalistas)	21,2 ± 1,3 bA
(hexano x forrageiras)	15,6 ± 2,0 cA
(hexano x soldados)	13,4 ± 1,2 dA
(disco limpo x jardineiras)	23,4 ± 1,1 bA
(disco limpo x generalistas)	23,2 ± 1,0 bA
(disco limpo x forrageiras)	17,0 ± 1,8 cA
(disco limpo x soldados)	12,4 ± 0,7 dA

Fonte: Autor, 2011.

Nota: <sup>1</sup>Letras minúsculas e maiúsculas diferentes nas colunas indicam, respectivamente, diferença significativa entre os tratamentos através do teste de Tukey-HSD (P<0,05) e em relação ao controle pelo teste de Dunnett-t (P<0,05).

Na avaliação do comportamento de toque na fonte (Tabela 4), houve diferença significativa de resposta ( $p < 0,05$ ); porém, neste caso, a casta forrageira respondeu de maneira similar a casta generalista apesar de a primeira ser numericamente maior. Ambas apresentaram melhor resposta, diferindo estatisticamente das demais. Do mesmo modo, houve diferença significativa em relação ao controle, onde não foram constatadas respostas para este tratamento, bem como para o tratamento-testemunha ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4 - Valores de marcação de território (comportamento de toque na fonte) de formigas de *Atta opaciceps* de diferentes castas (casta 1: Jardineiras, casta 2: generalistas, casta 3: forrageiras, casta 4: soldados) submetidas ao extrato de forrageiras (tratamento 1), ao hexano (tratamento 2-controle) e ao disco limpo (tratamento 3-testemunha).**

Fatores	Variáveis
Tratamento x Casta	(Média±DP)
	Toque na fonte <sup>1</sup>
(forrageiras x jardineiras)	0,0 ± 0,0 aA
(forrageiras x generalistas)	2,2 ± 0,9 bB
(forrageiras x forrageiras)	4,8 ± 1,7 bB
(forrageiras x soldados)	0,2 ± 0,2 aA
(hexano x jardineiras)	0,0 ± 0,0 aA
(hexano x generalistas)	0,0± 0,0 aA
(hexano x forrageiras)	0,0± 0,0 aA
(hexano x soldados)	0,0± 0,0 aA
(disco limpo x jardineiras)	0,0± 0,0 aA
(disco limpo x generalistas)	0,0± 0,0 aA
(disco limpo x forrageiras)	0,0± 0,0 aA
(disco limpo x soldados)	0,0± 0,0 aA

Fonte: Autor, 2011.

Nota: <sup>1</sup>Letras minúsculas e maiúsculas diferentes nas colunas indicam, respectivamente, diferença significativa entre os tratamentos através do teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ) e em relação ao controle pelo teste de Dunnett-C ( $P < 0,05$ ).

## 7 DISCUSSÃO

Esta é a primeira demonstração experimental da evidência de feromônio de marcação de território em *A. opaciceps*. Os comportamentos exibidos pelas formigas desta espécie diante dos extratos de indivíduos coespecíficos são característicos daqueles correspondentes a reconhecimento e marcação de território, em *A. sexdens rubropilosa*, descrito por Vilela (1983). Nesta espécie, diante de um novo substrato ou sobre um território marcado com secreções de outra formiga, a mesma curva o abdômen ventralmente e a marcação de território é feita com deposição do feromônio produzido na ponta do gáster. Tais comportamentos também foram descritos posteriormente para *A. cephalotes* e *A. laevigata* (SALZEMAN; JAFFÉ, 1990; SALZEMAN et al., 1992).

Os autores acima citados evidenciaram que as marcas territoriais têm duas funções complementares. Uma é claramente antagonística, para que as formigas intrusas se tornem submissas, enquanto as residentes em territórios marcados se mostrem alertadas e agressivas. A segunda função é de orientação: operárias da mesma colônia usam as marcas químicas para distinguir as várias entradas do ninho, o que lhes facilita a orientação constante para determinada entrada. Além disso, a espécie estudada no presente trabalho, não exibiu somente comportamento de marcação e reconhecimento, mas também comportamentos secundários, tais como, movimento rápido e antenação, que podem ser explicados pelo fato da antena ser o órgão olfatório primário da maioria dos insetos e possuir quimiorreceptores que capturam componentes voláteis liberados a partir de uma fonte de odor (GULLAN; CRANSTON, 1994). Desta forma, o reconhecimento e marcação de território permite a formigas cortadeiras como *A. opaciceps* a garantia de alimento necessário para a colônia, além da defesa contra intrusos incluindo em alguns casos, além da área ao redor do ninho, as trilhas-tronco.

Ficou evidente que a função da casta forrageira é muito importante nesse processo de reconhecimento e marcação. Tanto na emissão quanto na recepção do feromônio, esta casta é responsável pelo maior eliciamento de resposta em operárias de outras castas bem como na eficiência da resposta ao seu próprio feromônio. Neste sentido, segundo Whitehouse e Jaffé (1996), o comportamento territorial de formigas cortadeiras é parte de um sistema complexo de defesa dos

seus recursos. Nesse sistema, a defesa de um recurso, por exemplo, o material de forrageamento, pode evoluir para a defesa de outro, isto é, do ninho propriamente dito. O recrutamento de operárias maiores está associado à marcação química (por meio das secreções das glândulas de Dufour) além de ameaças coespecíficas e interespecíficas. Conseqüentemente, castas como as forrageiras desempenham funções de recrutamento e defesa. Através de experimentos de campo, concluiu-se que ocorre diferenciação na eficiência da regulação de comportamentos tais como os de alarme entre castas coespecíficas em *A. laevigata* (JAFFÉ, 1987; WHITEHOUSE; JAFFÉ, 1995). Observações similares foram descritas para *A. capiguara* (HUGHES; GOULSON, 2001).

A participação das secreções da glândula de Dufour na marcação territorial foi evidenciada em *A. laevigata* (SALZEMAN et al., 1992). Os principais componentes dessa glândula nessa espécie são alcenos e alcanos. O (Z)-9-tricoseno, o (Z)-9-nonadeceno, o 8,11-nonadecadieno e o n-heptadeceno foram encontrados em formigas cortadeiras provenientes de territórios marcados naturalmente (EVERSEHD; MORGAN, 1980, 1981). Desses compostos, apenas o 8,11-nonadecadieno (JAFFÉ; BAZIRE-BENAZET; HOWSE, 1979) e o (Z)-9-nonadeceno (VILELA, 1983) foram, até o presente, relacionados como possíveis componentes do feromônio de território em espécies de *Atta*.

## 8 CONCLUSÕES

Em formigas cortadeiras da espécie *A. opaciceps* a casta forrageira, é a responsável pela marcação do território do ninho. Esta consegue através do seu feromônio eliciar todas as outras castas quanto à marcação de território.

A casta forrageira também é a casta determinante do reconhecimento do próprio feromônio e das demais castas.

## 9 CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho permitiu concluir, de modo geral, que o sistema de comunicação de *Atta opaciceps* é regulado de acordo com a função atribuída as suas castas morfológicas. Deste modo, a casta forrageira é a responsável pelo eliciamento do comportamento de trilha e marcação de território além de perceber ambos de maneira mais eficiente e, em relação às outras castas. Por sua vez, a composição química do feromônio de trilha assemelha-se á de outras espécies. De modo que, o mesmo possui compostos nitrogenados, tais como M4MPC, identificado como feromônio de trilha de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*.

## REFERÊNCIAS

- BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, London, v. 20, p. 1-6, 1995. ISSN 0307-6962.
- CHERRETT, J. M.; POWELL, R. J.; STRADLING, D. J. The mutualism between leaf-cutting ants and their fungus. In: WILDING, N.; COLLINS, N. M.; WEBBER, J. F. (Ed.). **Insect-fungus interactions**. London: Academic Press, 1989. p. 93-120.
- EVERSHED, R. P.; MORGAN, E. D. A chemical study of the dufour gland of two attini ants. **Insect Biochemistry**, Bristol, v. 11, p. 443-351, 1980. ISSN 0020-1790.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Chemical investigations of dufour gland contents of the attini ants. **Insect Biochemistry**, Bristol, v. 13, p. 469-479, 1981. ISSN 0020-1790.
- FRANCELINO, M. R. V. et al. The mandibular gland secretions of the leaf-cutting ants *Atta sexdens sexdens* and *Atta opaciceps* exhibit intercaste and intercolony variations. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, p. 643-656, 2006. ISSN 0098-033.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **The insects**: an outline of entomology. London: Chapman & Hall, 1994.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990.
- HUGHES, W. O. H.; GOULSON, D. Polyethism and the importance of context in the alarm reaction of the grass-cutting ant. *Atta capiguara*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 49, p. 503-508, 2001. ISSN 0340-5443.
- \_\_\_\_\_. et al. Workers caste polymorphism has a genetic basis in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Proceedings Natural Academic Science USA**, Washington, v. 100, p. 9394-9397, 2003. ISSN 0369-8203.
- JAFFÉ, K. Evolution of territoriality and nestmate recognition systems in ants. **Experientia**, Basel, v. 54, p. 295-311, 1987. ISSN 0014-4754.
- \_\_\_\_\_; BAZIRE-BENAZET, M.; HOWSE, P. An integumentary pheromone-secreting gland in *Atta* sp. : territorial marking with a colony specific pheromone in *Atta cephalotes*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 25, p. 833-839, 1979. ISSN 0022-1910.
- \_\_\_\_\_. et al. Worker caste determination in the army ant *Eciton burchelli*. **Biological Letters**, v. 3, p. 513-516, 2007. ISSN 1744-957X.

KLEINEIDAM, W. O. H. et al. A macroglomerulus in the antennal lobe of leaf-cutting ant workers and its possible functional significance. **Chemical Senses**, Oxford, v. 30, p. 383-392, 2005. ISSN 0379-864X.

MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970.

NORTH, R. D.; JACKSON, C. W.; HOWSE, P. E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. **Tree**, v. 12, p. 386-389, 1997. ISSN 1432-2285.

SALZEMAN, A.; JAFFÉ, K. On the territorial behavior of field colonies of the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 36, p. 133-138, 1990. ISSN 0022-1910.

\_\_\_\_\_. et al. Leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Formicidae: Attini) marks its territory with colony-specific dufour gland secretion. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 18, p. 183-196, 1992. ISSN 0098-033.

SUDD, J. H. **An introduction to the behaviour of ants**. London: E. Arnold, 1967.

VILELA, E. F. **Behavior and control of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Attini)**. 1983, 209 f. Tese (Ph.D) - University of Southampton, Southampton, 1983.

\_\_\_\_\_; DELLA LÚCIA, T. M. C. Comunicação química. In: DELLA LÚCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa, MG, Folha de Viçosa, 1993. p. 106-130.

WADDINGTON, S. J. et al. Genetic polyethism in leaf-cutting ants. **Behavioral Ecology**, New York, v. 128, p. 1-5, 2010. ISSN 1045-2249.

WHITEHOUSE, M. E. A.; JAFFÉ, K. The ant wars: combat strategies, territoriality and nest defense in the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. **Animal Behavior**, London, v. 51, p. 1207-1217, 1996. ISSN 0003-3472.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Nestmate recognition in the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. **Insectes Sociaux**, v. 42, p. 157-166, 1995. ISSN 1420-9098.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: *Atta*): IV colony ontogeny of *A.cephalotes*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.14, p. 55-60, 1983. ISSN 0340-5443.

\_\_\_\_\_. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*): I. the overall pattern in *Atta sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 7, p. 143-156, 1980. ISSN 0340-5443.