

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

**Variações no perfil de hidrocarbonetos cuticulares das operárias de *Atta  
sexdens* (Myrmicinae: Attini)**

LOHAN CLAUDIO ABREU VALADARES

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
USP, como parte das exigências para a obtenção  
do título de Mestre em Ciências, Área:  
ENTOMOLOGIA.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2014

Lohan Claudio Abreu Valadares

Orientador: Prof. Dr. Fabio Santos do Nascimento

**Variações no perfil de hidrocarbonetos cuticulares das operárias de *Atta sexdens***

**(Myrmicinae: Attini)**

Ribeirão Preto – SP

2014



***Aos meus pais,  
Maria e José, pelo bom exemplo de amor,  
honestidade e simplicidade***



***Às minhas irmãs,  
Eleuza, Eliuza, Evenus e Evanilde  
pela dedicação, carinho e respeito***



***Aos meus sobrinhos,  
Renata, Eduardo, Gabriel e Luísa  
pelas boas lembranças***



***Ao Lincoln,  
Pela amizade e companheirismo***

***Dedico...***



*“Dou respeito às coisas desimportantes e aos seres desimportantes. Prezo insetos mais que aviões; prezo a velocidade das tartarugas mais que a dos mísseis. Eu fui aparelhado para gostar de passarinhos e tenho abundância de ser feliz por isso. Meu quintal é maior do que o mundo.”*

**Manoel de Barros**

## *Agradecimentos*

Ao Prof. Dr. Fabio Santos do Nascimento pela oportunidade de realizar esse trabalho sob sua orientação, acessibilidade e respeito com que sempre tratou o meu trabalho.

À Universidade de São Paulo, em especial ao Programa de Pós-graduação em Entomologia juntamente com todos os professores, alunos e funcionários, por contribuírem com minha formação acadêmica e principalmente por me ensinarem a indagar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

À MSc. Daniela Lima do Nascimento por compartilhar parte da autoria desse trabalho, mas especialmente pela amizade que tornou minha vida em Ribeirão Preto muito mais agradável.

À Dra. Denise de Araujo Alves por ter sempre os melhores conselhos (acadêmicos ou não), além da preciosa amizade e alegrias compartilhadas.

Às pós-graduandas da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Dra. Maria Cláudia Guidetti Campos e Dra. Maria Juliana Caliman pelo imenso carinho e boa disposição que sempre tiveram ao me ensinar.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Zucchi, Prof. Dr. Odair Bueno e à Carla Berlocher pela gentileza ao me concederem as colônias.

Aos amigos do Laboratório de Comportamento e Ecologia de Insetos Sociais pela acolhida em Ribeirão Preto e todos os momentos felizes que passamos juntos.

Aos colegas do Laboratório de Insetos Sociais/Praga (LISP) da UNESP de Botucatu, em especial ao Prof. Dr. Luiz Carlos Forti, por me apresentar o apaixonante mundo das formigas cortadeiras enquanto escavávamos as colônias de *Atta capiguara*, foi tudo muito divertido!

Às minhas queridas amigas de Rondonópolis pelas saudosas lembranças e por serem as melhores amigas do mundo, sempre: Elizabeth, Gabriela, Geisiane, Marcella, Marlei e Paty.

Ao Lincoln, por estar sempre perto quando mais preciso e que por muitas vezes me auxiliou a cuidar das formigas.

À minha maravilhosa família por todo apoio e carinho que sempre tive. Vocês são meu porto seguro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado...

**O meu muito obrigado**

## RESUMO

A integridade das sociedades de insetos depende da capacidade dos indivíduos em discriminar aqueles que não pertencem às suas colônias; essas interações de reconhecimento são mediadas por hidrocarbonetos presentes na camada de cera da cutícula e atuam como mensageiros que codificam informação sobre o meio interno (colônia) e externo (ambiente). Os hidrocarbonetos são produzidos por células dérmicas e o perfil desses compostos recebe influência tanto de fontes endógenas quanto exógenas e isso o torna suscetível às mudanças temporais. A caracterização desses compostos em insetos-praga é importante, pois provém subsídios tanto para pesquisa básica como para o manejo e controle de pragas. Nesse contexto, o presente estudo abordou as variações dos hidrocarbonetos cuticulares em relação às subcastas morfológicas das operárias (condição endógena) e utilização do substrato foliar (variável exógena) na formiga-cortadeira *Atta sexdens*, conhecida como uma das principais pragas herbívoras da região Neotropical. Os compostos foram extraídos em solvente apolar hexano e as amostras foram analisadas em sistema de cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massas (CG-MS). Foram identificados 30 hidrocarbonetos com cadeia carbônica entre 19 e 40 átomos distribuídos em três classes de compostos, sendo a dos hidrocarbonetos ramificados a mais representativa, especificamente os trimetilcanos. Foram encontradas variações significativas para todas as variáveis analisadas, sugerindo que as subcastas possuem assinaturas químicas semelhantes quanto à diversidade de compostos, mas com grandes diferenças na proporção relativa dos mesmos. Em relação ao substrato foliar, colônias que tiveram acesso ao mesmo recurso apresentam uma composição química cuticular mais semelhante em relação àquelas que tiveram acesso a um recurso diferente. Complementarmente, os testes comportamentais mostraram que, na presença de uma coespecífica intrusa, as operárias residentes são muito mais agressivas em relação àquelas que utilizaram outro tipo de substrato foliar.

**Palavras-chave:** hidrocarbonetos cuticulares, *Atta sexdens*, subcasta morfológica, substrato foliar.

## **ABSTRACT**

The integrity of insect societies relies on the ability of individuals to discriminate between nestmates from non-nestmates. These interactions are mediated by hydrocarbons spread all over the cuticle that act as messengers coding information about the colony and external environment. Cuticular hydrocarbons are produced by dermic cells and its composition is influenced by both endogenous and exogenous sources which makes them subject to temporal changes. Thus, this study approached the variations on this chemical profile in relation to the worker subcastes and type of foliar substrate used by leafcutter ant *Atta sexdens*, this species is known as one of the major neotropical herbivore pests and this kind of study is important because it can provide subsidies in researches related to both basic biology as to pest control methods. The compounds were extracted using apolar solvent (hexane) and the samples were analyzed using gas chromatography - mass spectrometry technique (GC-MS). It was found 30 hydrocarbons which carbon chains varies between 19 and 40 atoms separated in three classes of compounds and the branched hydrocarbons as the most abundant one, especially the trimethylalcanes. The statistical analysis revealed significant differences on all the variables analyzed suggesting that subcastes possess similar chemical signatures as to the variety of compounds but with great differences in relative proportions thereof. Furthermore, the results show that foliar substrate has influence on the composition of cuticular hydrocarbons and concomitantly affect the interspecific recognition, thus colonies that had access to the same substrate has similar cuticular composition comparing to those who do not. Additionally, behavior tests showed that in the presence of a conspecific intruder the resident workers tend to be much more aggressive in relation to those who had fed on a different foliar substrate.

**Key-words:** Cuticular hydrocarbons, *Atta sexdens*, morphological subcaste, foliar substrate.



## ÍNDICE

<b>Introdução geral</b> .....	11
<b>Capítulo 1. Variação do perfil de hidrocarbonetos cuticulares em relação às subcastas de operárias de <i>Atta sexdens</i></b>	
Resumo.....	22
Abstract.....	23
Introdução.....	24
Metodologia.....	26
Resultados.....	29
Discussão.....	41
<b>Capítulo 2. Influência do substrato foliar no perfil de hidrocarbonetos cuticulares em operárias de <i>Atta sexdens</i></b>	
Resumo.....	47
Abstract.....	48
Introdução.....	49
Metodologia.....	50
Resultados.....	56
Discussão.....	63
<b>Considerações Finais</b> .....	71

## *Introdução Geral*

**A**eussocialidade é a forma mais avançada de organização social, caracterizada pela sobreposição de gerações e cuidado cooperativo da prole, há ainda uma diferenciação de castas em que a maioria dos indivíduos que formam um grupo deixa, parcial ou totalmente, de se reproduzir e coopera para o sucesso reprodutivo de outros (Wilson, 1971). Assim, há um aumento direto na aptidão inclusiva dos indivíduos beneficiados, mas há também um aumento indireto na aptidão dos próprios altruístas, já que essa relação se estabelece entre indivíduos geneticamente relacionados (Hamilton, 1964). Uma vez estabelecida essa relação, aqueles que se ocuparam da manutenção de suas colônias puderam se especializar de tal forma que propiciam melhor eficiência dessas atividades (Hölldobler & Wilson, 1990; Sendova-Franks & Franks, 1999).

A distribuição de atividades com base na idade dos indivíduos, ou polietismo etário, é a forma mais ubíqua de alocação de tarefas entre os insetos sociais. Nesse caso, operárias mais jovens tendem a permanecer dentro do ninho desenvolvendo atividades relacionadas ao cuidado com a prole e a rainha. À medida que envelhecem, as operárias tendem a executar atividades relacionadas ao exterior da colônia, como forrageamento e defesa da colônia (Beshers & Fewell, 2001). O polietismo morfológico, diferenciação morfológica associada ao repertório comportamental, das operárias é outra forma de alocação de tarefas e está presente nos grupos altamente eussociais de formigas (Oster & Wilson, 1978). Em formigas cortadeiras, a diferenciação morfológica das operárias é resultante da quantidade de alimento que elas ingerem quando ainda são larvas (Wilson, 1983). A formiga cortadeira do gênero *Atta* é o exemplo clássico de polietismo morfológico em insetos sociais, sendo que Wilson (1980) a define como o caso extremo desse sistema de alocação.

Paralelamente, a eussocialidade pode evoluir graças ao mecanismo eficiente de reconhecimento desses insetos que permitem que atos altruístas sejam direcionados a

organismos próximos geneticamente. O processo de reconhecimento entre membros aparentados que formam uma colônia e a discriminação daqueles que são estranhos ao seu grupo pode ser classificado em três componentes principais: produção, percepção e continuidade (Sherman *et al.*, 1997; Starks, 2004).

O processo de produção requer um componente visual ou químico, ou mesmo um conjunto de pistas, usado pelos indivíduos para o reconhecimento individual (D'Etorre & Heinze, 2005; Sheehan & Tibbetts, 2011; Tibbetts, 2002). O processo de percepção e reconhecimento envolve um mecanismo pelo qual o indivíduo detecta o componente ou sinal, comparando a representação pré-formada do odor colonial ou *template* com aquela do indivíduo sinalizador (rótulo ou *label*). Já o processo de resposta ou continuidade, normalmente, ocorre sob a forma de reações escalonadas entre ignorar o indivíduo, passando pela antenação continuada até à agressão extrema seguida de morte do indivíduo sinalizador e do receptor (Sherman *et al.*, 1997).

Em insetos sociais, sabe-se que a comunicação é mediada principalmente por compostos químicos (Vander Meer & Morel, 1998). Os hidrocarbonetos são os compostos mais comumente encontrados em lipídios cuticulares assim como em glândulas exócrinas dos insetos (Provost *et al.* 2008; Blomquist, 2010). Sua função primária é a proteção contra perda de água, mas devido a sua complexidade estrutural, eles evoluíram sob a forma de feromônios de reconhecimento que transmitem uma identidade individual aos membros da sociedade de insetos (Blomquist, 2010).

Os hidrocarbonetos são compostos apolares que apresentam apenas carbono e hidrogênio em sua estrutura, sendo separados em hidrocarbonetos saturados (alcanos) e insaturados (alceno e alcino, que apresentam dupla e tripla ligação, respectivamente) (Blomquist, 2010). Nos insetos, os hidrocarbonetos cuticulares são encontrados na epicutícula, e nos últimos 20 anos vários estudos vêm demonstrando que esses compostos são

espécie-específicos, entretanto, variações na proporção desses compostos conferem especificidade também em nível colonial (Martin & McConnel 1970; Tannure-Nascimento *et al.*, 2007).

Por estarem associados tanto à genética quanto ao meio ambiente, os perfis de hidrocarbonetos cuticulares (também referidos como CHCs) podem ser influenciados tanto pela fisiologia, como pela idade, dieta e especificidade em alguma(s) tarefa(s) (Lambardi *et al.* 2004; Marinho *et al.* 2008; Liebig *et al.* 2009; Ferreira-Caliman *et al.* 2010; Campos *et al.* 2012). Essas informações também são usadas como sinais que aumentam a eficiência do trabalho, como evidenciado na formiga *Pogonomyrmex barbatus* em que na entrada da colônia, a presença dos hidrocarbonetos cuticulares do subgrupo de operárias que patrulham as trilhas de forrageamento incita a atividade de forrageio em outras operárias (Greene & Gordon, 2003).

#### **Modelo de estudo: *Atta sexdens* (Formicidae: Myrmicinae: Attini)**

As formigas Attini, assim como homem e algumas espécies de cupins e besouros, são conhecidas por cultivarem fungos que são utilizados para sua alimentação. Os fungos, por sua vez, são beneficiados pela proteção contra patógenos, nutrição e dispersão proporcionada pelas formigas (Hölldobler & Wilson, 1990; Mehdiabadi & Schultz, 2010). Apesar de formarem um grupo diverso, com 13 gêneros e, aproximadamente 230 espécies descritas (Schultz & Brady, 2008), elas compartilham muitos aspectos biológicos graças à co-evolução com tais fungos da tribo Leucocoprineae (exceto para as formigas do complexo *Apterostima pilosum*, que cultivam fungos da família Pterulaceae) (Mehdiabadi & Schultz, 2010).

Ainda no ninho de origem, a rainha virgem armazena em sua cavidade infrabucal, tufo de micélio do fungo simbiote. Após a revoada nupcial, ela encontra um local ideal para nidificação e então expelle os micélios para dar origem ao jardim de fungo de sua futura

colônia. A fundação normalmente ocorre por haplometrose e as colônias tendem a ser monogínicas (Fernández-Marín *et al.* 2004). Entre 40 e 60 dias após a revoada nupcial, surgem as primeiras operárias, que assumem o cuidado com o fungo e com a futura prole da rainha. Esta, por sua vez, fica responsável apenas da oviposição (Weber, 1972; Forti & Boaretto, 1997; Mehdiabadi & Schultz, 2010). A simbiose estabelecida entre as formigas *Attini* e seus fungos rendeu-lhes o título de verdadeiras agricultoras.

Ao forragear, a maioria das espécies da tribo procura por tecido vegetal em decomposição e fezes de outros insetos. Porém, nas espécies do gênero *Atta* e *Acromyrmex*, popularmente conhecidas como formigas-cortadeiras, trazem para o ninho partes vivas das plantas, como flores, sementes, folhas e frutos (Fernández-Marín *et al.* 2004; Mehdiabadi & Schultz, 2010). Devido a esse hábito, esses superorganismos são conhecidos como as principais pragas herbívoras da região Neotropical e o Brasil é o país com maior diversidade, sendo constatadas 10 espécies e três subespécies para o gênero *Atta*, e 20 espécies e nove subespécies para *Acromyrmex* (Vilela 1986; Hölldobler e Wilson 1990; Della-Lucia *et al.* 1993).

Vários fatores contribuem para que essas peculiares formigas se tornem pragas, por exemplo, a habilidade de cortar muitas espécies de plantas, elevada densidade de colônias e ampla distribuição geográfica (Hölldobler e Wilson, 1990; Costa *et al.* 2008). Não se esquecendo, porém, sua vital importância para manutenção dos ecossistemas, pois elas não só estimulam o crescimento das plantas através da poda, como também promoverem drenagem e aeração do solo e também participam da ciclagem de nutrientes do mesmo (Hölldobler e Wilson, 1990).

O sucesso biológico dessas formigas é, em grande parte, devido ao intrincado sistema de divisão de trabalho associado à diferenciação morfológica das operárias (Wilson 1980; Hölldobler & Wilson 1990; Forti & Boaretto 1997). Particularmente interessante, a formiga

*Atta sexdens* possui um dos mais avançados sistemas de divisão de trabalho por polietismo morfológico, onde encontramos quatro subcastas: as jardineiras, as generalistas, as forrageiras e as soldadas (Wilson, 1980). A alocação de tarefas entre as subcastas permite que o material vegetal seja processado eficientemente como em uma linha de produção, ocorrendo sucessão das atividades de acordo com o tamanho das operárias. As jardineiras (largura da cápsula cefálica: 0,8-1,0 mm) normalmente cuidam da rainha e das hifas, além de implantarem as pequenas partículas de substrato foliar ao fungo. As generalistas (largura da cápsula cefálica:  $\cong$  1,4 mm) degradam a vegetação antes da incorporação ao jardim de fungo, transportam outras operárias, assistem à prole durante a ecdise, cuidam da rainha e do fungo e descartam o lixo. As forrageiras (largura da cápsula cefálica: 2,0-2,2 mm) exploram, coletam e cortam a vegetação nova e também escavam o ninho. Já as soldadas (largura da cápsula cefálica:  $>$  3,0 mm) são as que podem mais eficientemente proteger o ninho.

### **Objetivos e organização da Dissertação**

Sumariamente, este estudo foi motivado pelo interesse em agregar informações a respeito das variações no perfil de hidrocarbonetos cuticulares em relação às condições endógenas e exógenas em insetos sociais. Para atingir esse objetivo geral, a formiga-cortadeira *Atta sexdens* foi escolhida como espécie-modelo por diversos motivos. Primeiro, ela apresenta um acentuado polietismo morfológico como condição endógena e detalhadamente estudado por Wilson (1980). Segundo, as colônias são facilmente mantidas em ambientes artificiais, possibilitando o controle de algumas variáveis exógenas. E, por último, mas não menos relevante, concerne à importância de estudos sobre compostos feromoniais em insetos-praga, que ao certo podem ser usados como ferramentas no manejo integrado de desse inseto-praga.

Dessa forma, essa dissertação foi dividida em dois capítulos para uma melhor organização dos resultados e discussão, o que remete a algumas repetições textuais. A seguir, são apresentados os escopos de cada capítulo.

### **Capítulo 1. Variação do perfil de hidrocarbonetos cuticulares em relação às subcastas de operárias de *Atta sexdens***

Este capítulo apresenta através de análise descritiva e multivariada os dados referentes às variações do perfil de hidrocarbonetos cuticulares em relação às subcastas morfológicas das operárias de *A. sexdens*.

### **Capítulo 2. Influência do substrato foliar no perfil de hidrocarbonetos cuticulares em operárias de *Atta sexdens***

O escopo principal deste capítulo foi apresentar através de análise descritiva e multivariada os dados referentes à agressividade interespecífica e variação no perfil de hidrocarbonetos cuticulares relacionada ao substrato foliar utilizado para cultura do fungo simbiote, em operárias de *A. sexdens*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beshers, S. N.; Fewell, J. H. 2001. Models of division of labor in social insects. *Annu. Rev. Entomol.*, **46**:413–40.
- Blomquist, G. J.; Bagnères, A. G. 2010. Structure and analysis of insect hydrocarbons. In: Blomquist, G. J. (Ed). *Insect Hydrocarbons*. Cambridge University Press, Cambridge, 19-34 pp.
- Campos, M. C. G. C.; Campos, M. L. G.; Turatti, I. C.; Nascimento, F. S. 2012. Cuticular hydrocarbon variation of Castes and Sex in the Weaver Ant *Camponotus textor* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. **59**: 1025-1035.
- D’Ettorre, P.; Heinze, J. 2005. Individual recognition in ant queens. *Curr. Biol.*, **15**: 2170-2174.
- Della-Lucia, T. M. C.; Folwer, H. G.; Araújo, M. S. 1993. Castas de formigas cortadeiras. In: Della-Lucia, T. M. C. (Ed). *As Formigas Cortadeiras*. Folha de Viçosa, Viçosa, 43-53 pp.
- Fernández-Marín, H.; Zimmerman, J. K.; Weislo, W. T. 2004. Ecological traits and evolutionary sequence of nest establishment in fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). *Biological Journal of Linnean Society*, **81**: 39-48.
- Ferreira-Caliman, M. J.; Nascimento, F. S.; Turatti, I. C.; Mateus, S.; Lopes, N. P.; Zucchi, R. 2010. The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. *Journal of Insect Physiology*, **56**: 800-804.
- Ford E. B. 1940. Polymorphism and taxonomy. In Huxley, J. (Ed). *The new systematics*, Oxford, 493-583 pp.
- Forti, L. C; Boaretto, M. A. C. 1997. *Formigas Cortadeiras: Biologia, Ecologia, Danos e Controle*. Botucatu, 61 pp.

- Greene, M. J.; Gordon, D. M. 2003. Cuticular hydrocarbons inform task decisions. *Nature*, **423**: 423-432.
- Hamilton, W.D. 1964. The genetical evolution of social behaviour. *Journal of Theoretical Biology*, **7**: 1-16.
- Hölldobler, B.; Wilson, E. O. 1990. *The Ants*, Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, 732 pp.
- Lambardi, D.; Chegia, B.; Turilazzi, S.; Boomsma, J. J. 2004. Diet-induced aggression among colonies of the leafcutter ant *Acromyrmex echinator* Forel (Hymenoptera Formicidae). *REDIA, LXXXVII*, **21**: 219-221.
- Liebig, J.; Eliyahu, D.; Brent, C. S. 2009. Cuticular hydrocarbon profiles indicate reproductive status in the termite *Zootermopsis nevadensis*. *Behav Ecol Sociobiol*, **63**: 1799-1807.
- Marinho, G. C. S.; Della-Lucia, M. T. C.; Ribeiro, M. M. R.; Magalhães, S. T. V.; Guedes, R. N. C. & Jham, G. N. 2008. Interference of b-Eudesmol in nestmate recognition in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Bulletin of Entomological Research*, **98**: 467-473.
- Martin, M.M.; MacConnel, J. G. 1970. The alkanes of *Atta colombica*. *Tetrahedron*, **26**: 307-319.
- Mehdiabadi, N. J.; Schultz, T. R. 2010. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Myrmecological news*, **13**: 37-55.
- Oster, G. & Wilson, E. O. 1978. *Caste and ecology in the social insects*. Princeton Univ. Press., Princeton, 352pp.

Provost, E.; Blight, O.; Tirard, A.; Renucci, M. 2008. Hydrocarbons and insects' social physiology. In: Maes, R. P. (Ed). *Insect Physiology: New Research*, 327 pp.

Schultz, T. R.; Brady, S. G. 2008. Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **14**: 5435-5440.

Sendova-Franks, A. B.; Franks, N. 1999. Self-assembly, self-organization and division of labour. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **354**: 1395-1405.

Sheehan, M.J.; Tibbetts, E. A. 2012. Specialized Face Learning Is Associated with Individual Recognition in Paper Wasps. *Science*, **334**: 1272-1275.

Sherman, P.W.; Reeve, H .K.; Pfeenig, D. W. 1997. Recognition systems. In Krebs, J. R.; Davies, N. B. (Eds.) *Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach*. Blackwell Science, Oxford, 464 pp.

Starks, P.T. 2004. Recognition systems: from components to conservation. *Ann. Zool. Fenn.* **41**: 689–690.

Tannure-Nascimento, I. C.; Nascimento, F. S.; Turatti, I. C.; Lopes, N. P.; Trigo, J. R. & Zucchi, R. 2007. Colony membership is reflected by variations in cuticular hydrocarbon profile in a neotropical paper wasp, *Polistes satan* (Hymenoptera, Vespidae). *Genetics and Molecular Research*, **6**(2): 390-396.

Tibbetts, E. A. 2002 Visual signals of individual identity in the paper wasp *Polistes fuscatus*. *Proc. R. Soc. Lond*, **269**: 1423–1428.

Vander Meer, R. K.; Morel, L. 1998. Nestmate recognition in ants. In: Vander Meer, R. K.; Breed. M.; Wintson, M.; Espelie, K. E. (Eds). *Pheromone Communication in Social Insects*. Westview Press, 384 pp.

Vilela, E. F. 1986. Status of leaf-cutting ant control in Forest plantations in Brazil. In: Lofgren, C.S.; Vander Meer, R. K. (Eds). *Fire ants and leaf-cuttings ants: biology and management*. Boulder: Westview Press, 435 pp.

Weber, N. A. 1972. *Gardening ants: The Attines*. Philadelphia: American Philosophical Society, 146 pp.

Wilson, E. O. 1971. *The Insect Societies*. Belknap Press of Harvard Univ. Press, Cambridge, 548 pp.

Wilson, E. O. 1980. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: *Atta*). I: The overall pattern in *A. sexdens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **7**: 143-156.

## *Capítulo 1*

**Variação do perfil de hidrocarbonetos cuticulares em relação às subcastas de operárias de *Atta sexdens***

## RESUMO

Uma das formas de distribuição de tarefas em formigas está associada ao polietismo morfológico das operárias, ou seja, as operárias podem passar grande parte do tempo realizando tarefa (s) específica (s) que desempenham mais eficientemente em função do seu tamanho corporal. A formiga cortadeira *Atta sexdens* é conhecida por possuir esse tipo de alocação de forma bastante complexa, pois possui o repertório comportamental de busca e alocação de recurso distribuído entre quatro subcastas morfológicas bem definidas. A distribuição dessas atividades não obedece a um controle central, entretanto os hidrocarbonetos cuticulares levam informações concernentes à individualidade dos grupos e podem ser utilizados como pistas de reconhecimento e decisão de tarefas. Dessa forma, esse estudo teve como motivação a investigação de possíveis variações no perfil de hidrocarbonetos cuticulares em relação às subcastas de *Atta sexdens*. Foram identificados 29 hidrocarbonetos com cadeias entre 19 e 39 átomos de carbono distribuídos em três classes de compostos, sendo a dos hidrocarbonetos ramificados a mais representativa, especificamente os trimetialcanos. Foram encontradas variações altamente significativas para as quatro subcastas, sugerindo assinaturas químicas semelhantes quanto à diversidade de compostos, mas com grandes diferenças na proporção relativa dos mesmos.

## ABSTRACT

In ant societies one of the forms of task distribution is associated with morphological polyethism of workers and they can spend great time performing size-related tasks. The leafcutter ant *Atta sexdens* is known because of their extreme task allocation where workers possess huge variation of size followed by idiosyncratic behavior repertory. The distribution of these tasks is not regulated by a central control and the major role of cuticular hydrocarbons is to codify information about the identity of groups that can be used as recognition and task decision cues. Thus, this study aimed to investigate possible variations on cuticular hydrocarbon profile of *Atta sexdens* workers related to the morphological subcastes. It was found 29 hydrocarbons which carbon chains vary between 19 and 39 atoms distributed in three classes of compounds and branched hydrocarbons as the most abundant one, especially trimethylalcanes. It was found highly significant variations in relation to the four subcastes suggesting similar chemical signatures as to the variety of compounds but with great differences in relative proportions thereof.

## INTRODUÇÃO

O fator chave para a evolução da organização social das formigas cortadeiras é a íntima associação entre os sistemas de alocação de tarefas com a utilização de material vegetal fresco como substrato para o crescimento do fungo simbiote. A adaptação estreita e idiosincrática que foi requerida para o sucesso em explorar uma nova fonte de alimento para o fungo marca a transição entre as aténeas monomórficas e as formigas cortadeiras, já que essas primeiras utilizam material orgânico em decomposição para alimentar o fungo, o que parece mais adequado à alimentação desses (Wilson, 1980; Mehdiabadi & Shultz, 2010).

Para que o material vegetal possa ser utilizado como a única forma de alimento para o fungo, as formigas precisam processá-lo como em uma linha de produção. As operárias maiores possuem capacidade de cortar e transportar as partes das plantas com mais eficiência, ao passo que as menores permanecem, em sua maioria, dentro do ninho e podem repicar, mastigar e adicionar enzimas aos pequenos fragmentos vegetais, para então implanta-los ao jardim de fungo (Wilson, 1980; Della-Lucia *et al.* 1993). Indivíduos de um mesmo tamanho, ou mesmo o mesmo indivíduo, podem realizar múltiplas funções, entretanto, a probabilidade de uma operária realizar uma tarefa particular é alta quando associada ao seu tamanho (Wilson, 1980).

Wilson (1980) ainda vai mais além e explora a origem e evolução das subcastas e, ao contrário do que ele esperava encontrar no “sistema raro e complexo que possui *A. sexdens*” apenas uma curva alométrica dá origem as quatro subcastas morfológicas. Interessantemente, ele postula que as adaptações comportamentais evoluíram mais do que as morfológicas, pois um número alto de tarefas ( $n=29$ ) é realizado por apenas quatro subcastas morfológicas das quais três (jardineiras, generalistas e forrageiras) ainda se subdividem em subcastas temporais divididas em dois grupos etários (recém-emergidas e operárias mais velhas), perfazendo um total de sete subcastas.



Nesse contexto, o nosso objetivo foi associar as quatro subcastas morfológicas de *A. sexdens* com o perfil de hidrocarbonetos cuticulares, buscando variações que possam estar associadas à assinatura química das mesmas.

## **METODOLOGIA**

### **Manutenção das colônias em laboratório**

As duas colônias mantidas em laboratório (Colônia 1 e Colônia 2) foram inicialmente coletadas na natureza durante a fase inicial de desenvolvimento (aproximadamente três meses de idade), e estavam naturalmente separadas por no mínimo 50 quilômetros de distância e foram coletadas pela equipe técnica do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP de Rio Claro e pelo Laboratório de Insetos Sociais-Praga (LISP) da UNESP de Botucatu.

As colônias foram acondicionadas em recipientes plásticos interconectados por tubos e tinham capacidade entre 1 e 10 litros que foram utilizados pelas formigas para estabelecer a área de forragem, potes de fungo e lixo. Foram oferecidas diariamente folhas frescas de roseira (*Rosa* sp.), hibisco (*Hibiscus* sp.), resedá (*Lagerstroemia indica*), jambolão (*Syzygium* sp.) e pingo de ouro (*Duranta* sp.), além de aveia e farinha de milho, seguindo a preferência alimentar da espécie. A temperatura e umidade do laboratório foram mantidas em torno de 25°C e 75%, respectivamente, segundo as recomendações de Della-Lucia (1993).

Os experimentos foram realizados quando as colônias já possuíam mais de dois anos de vida e possuíam aproximadamente cinco litros de fungo

### **Extração de hidrocarbonetos cuticulares das subcastas morfológicas**

Para caracterizar os perfis de hidrocarbonetos cuticulares das subcastas, foram utilizadas duas colônias mantidas em laboratório (Colônia 1 e Colônia 2) e uma colônia em ambiente natural (Colônia 3) localizada na cidade de Ribeirão Preto, *campus* da Universidade de São Paulo, que possuía murundu volumoso, disforme e com aproximadamente dois metros quadrados, característico de colônias grandes e adultas.

A *priori*, foram coletadas aleatoriamente 50 formigas que tiveram suas cápsulas cefálicas medidas para serem classificadas em suas subcastas de acordo com o trabalho de Wilson (1980) onde 0,8 mm, 1,6 mm 2,1 mm e 3,3 mm respectivamente representam as jardineiras, generalistas, forrageiras e soldadas. Dessas, cinco de cada subcasta foram montadas em alfinete entomológico para serem utilizadas como referência no momento da escolha dos indivíduos para as análises químicas cuticulares. Posteriormente, para cada colônia, 15 operárias de cada subcasta foram coletadas com auxílio de pinça entomológica desodorizada e então armazenadas em freezer com temperatura em aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$  até o procedimento da extração dos compostos cuticulares.

Pelo fato das operárias de *Atta* serem altamente polimórficas, foi feita uma correlação entre o tamanho da cápsula cefálica dos grupos e o volume de hexano utilizado para extração, a fim de que as concentrações das amostras permitissem a obtenção de cromatogramas compreensíveis. Para os grupos das jardineiras, generalistas e forrageiras foram utilizados 50, 100 e 130 microlitros de hexano para extração, com as formigas sendo imersas no solvente por 2 minutos, sem suspensão. Na subcasta das soldadas, a extração foi feita em 400 microlitros, com as formigas também imersas por 2 minutos no solvente e suspensão em 200 microlitros de hexano.

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massa CG-MS (SHIMADZU, modelo GCMS-QP2010) equipado com a coluna capilar de silicone de 25m e hélio com gás carreador à 1 ml/min. O método utilizado contava com duas rampas de temperatura, sendo a primeira  $150^{\circ}\text{-}280^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (temperatura máxima mantida por dez minutos) e a segunda  $280^{\circ}\text{-}300^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (temperatura máxima mantida por quinze minutos).

Para identificação de compostos que possuíam o espectro incompleto devido sua baixa concentração, foi preparado uma amostra concentrada ou *pool* contendo 20 operárias/colônia

imersas em 4 mililitros de hexano por 2 minutos. O solvente contendo os compostos foi evaporado e suspenso em 50 microlitros para injeção no GC-MS. A identificação contou também com o auxílio de um padrão sintético de hidrocarbonetos alcanos com cadeia entre 21 e 40 carbonos (Sigma-Aldrich).

### **Análise estatística**

Os compostos que estavam ausentes em mais de sete indivíduos de um grupo ( $n=15$ ) ou que contribuíam em menos de 0,5 % no total de compostos foram excluídos das análises. Foi realizada uma análise de variância PERMANOVA com 9999 permutações, onde os dados foram previamente normalizados e transformados por raiz quadrada e a matriz de semelhança (distância Euclidiana) calculada. Testes *post-hoc* (PERMANOVA, *pair-wise tests*) foram utilizados para comparação dos perfis químicos cuticulares entre as subcastas. A distância média dos centroides dos perfis químicos também foi calculada. Essas análises foram realizadas utilizando o programa Primer 6 (Primer-e Ltda).

## RESULTADOS

### As colônias

Em relação aos compostos apolares, a cutícula das operárias de *A. sexdens* apresenta uma grande diversidade de hidrocarbonetos com cadeia carbônica entre 19 e 39 átomos. Os trimetilados compõem a classe mais representativa, constituindo quase 40 % do total de compostos. Além desses, em ordem de maior representatividade, encontram-se os alcanos lineares, dimetilalcanos, alcadienos, alcenos e metilalcanos.

Todas as três colônias analisadas possuem perfis de hidrocarbonetos cuticulares muito semelhantes quanto à diversidade de compostos, entretanto, a análise estatística revelou diferença significativa entre elas (PERMANOVA, Pseudo-F = 48,537,  $p < 0,0001$ ). Quando as colônias foram comparadas em pares, as diferenças foram igualmente significativas (PERMANOVA, pair-wise tests,  $p < 0,0001$  para todas as comparações). Entretanto, ao calcular a distância entre os centroides e a distância média percebe-se que a colônia do ambiente natural (Colônia 3) é a mais distante quimicamente (Distância média para Col-1 vs. Col-2 5,5729; Col-1 vs. Col-3, 6,3373; Col-3 N vs. Col-2, 6,1614. Distância entre os centroides para Col-1 vs. Col-2, 3,2494; Col-1 vs. Col-3, 4,6597; Col-3 vs. Col-2 4,3609). Segundo a análise canônica, 99,4 % das operárias foram classificadas corretamente em suas colônias.

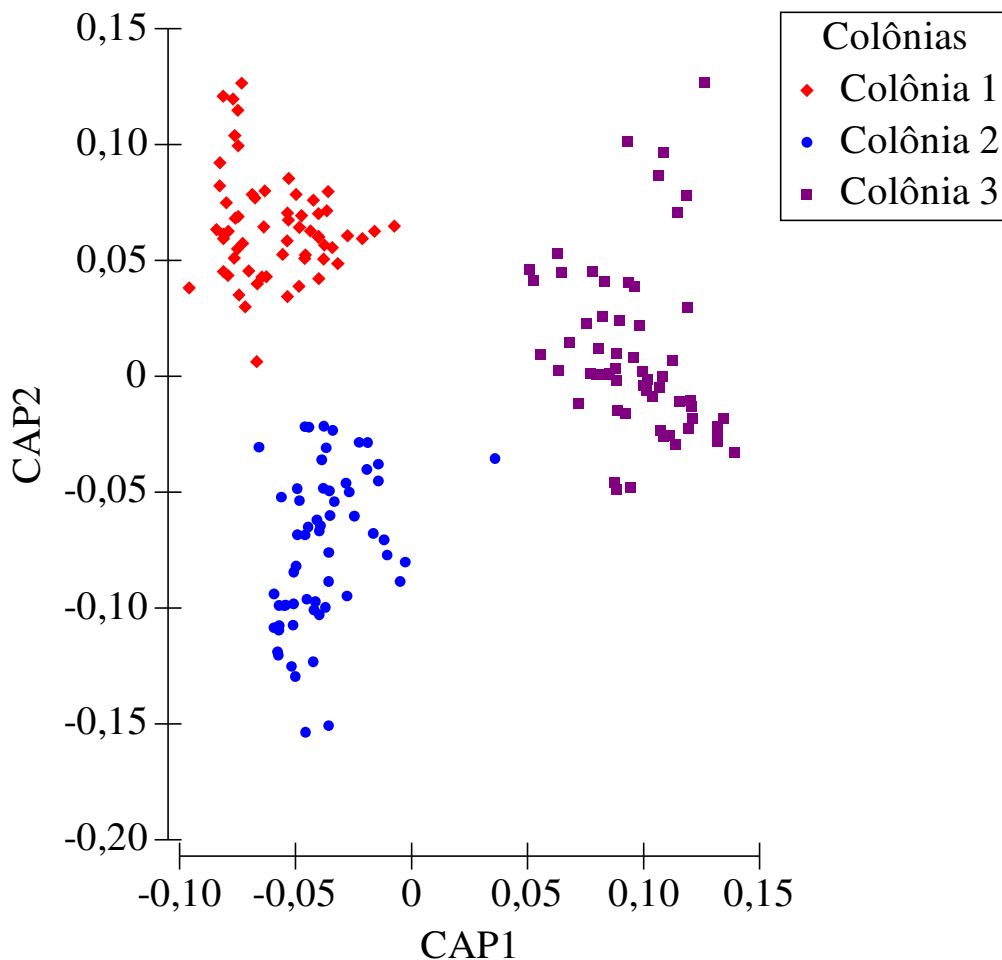


Figura 1 – Resultado da análise canônica das coordenadas principais (CAP) realizada com os hidrocarbonetos cuticulares das operárias de *Atta sexdens* de três colônias (colônia 1, colônia 2 e Colônia 3).

### As Subcastas

Dentro do perfil de hidrocarbonetos cuticulares das operárias existe uma variação em relação às subcastas, conferindo a essas uma identidade química cuticular. Quando rodamos a análise estatística com os dados agrupados das três colônias, percebemos que de uma forma geral todas as subcastas são quimicamente diferentes (PERMANOVA, Pseudo-F = 55,645,  $p < 0,0001$ ), resultado reconfirmado pelas comparações do teste *Pair-wise* (PERMANOVA, pair-wise tests,  $p < 0,0001$  para todas as comparações, exceto entre “generalista vs. soldada”

da colônia 1 com  $p > 0,0002$  e “jardineira vs. generalista” com  $p < 0,0004$  da colônia 3). A análise canônica ainda revela que houve 99,77 % de acerto na classificação das operárias de acordo com as subcastas. A seguir são apresentados os dados individuais de cada colônia.

### **Colônia 1**

As operárias da colônia 1 apresentaram um total de 22 hidrocarbonetos, sendo a maioria trimetilalcanos e alcanos lineares (tabela 1). Em relação ao perfil químico cuticular das subcastas, as generalistas apresentaram maior número de hidrocarbonetos, totalizando 20 compostos. Em seguida, em ordem de maior representatividade estão as jardineiras, com 18 hidrocarbonetos e as forrageiras e soldadas com 16.

Concernente à concentração, as soldadas possuem maior proporção relativa de alcanos lineares quando comparada a outras subcastas, e as jardineiras possuem maior proporção relativa de alcanos ramificados, exceto para os dois últimos compostos da tabela 1 (*a,b,c-TriMeC37* e *a,b,c-TriMeC39*), nesses, as forrageiras possuem concentrações muito superiores e juntos constituem mais de 40 % da concentração relativa desses compostos.

Os dados da análise canônica revelam que 100 % das operárias foram classificadas corretamente em suas subcastas e que de uma forma geral, todas são quimicamente diferentes (PERMANOVA, Pseudo-F = 56,641,  $p < 0,0001$ ). Todas as comparações feitas pelo teste *Pairwise* resultaram no valor de  $p < 0,0001$ . Interessantemente, os resultados mostram que a subcasta mais distante quimicamente é a forrageira (Tabelas 2 e 3).

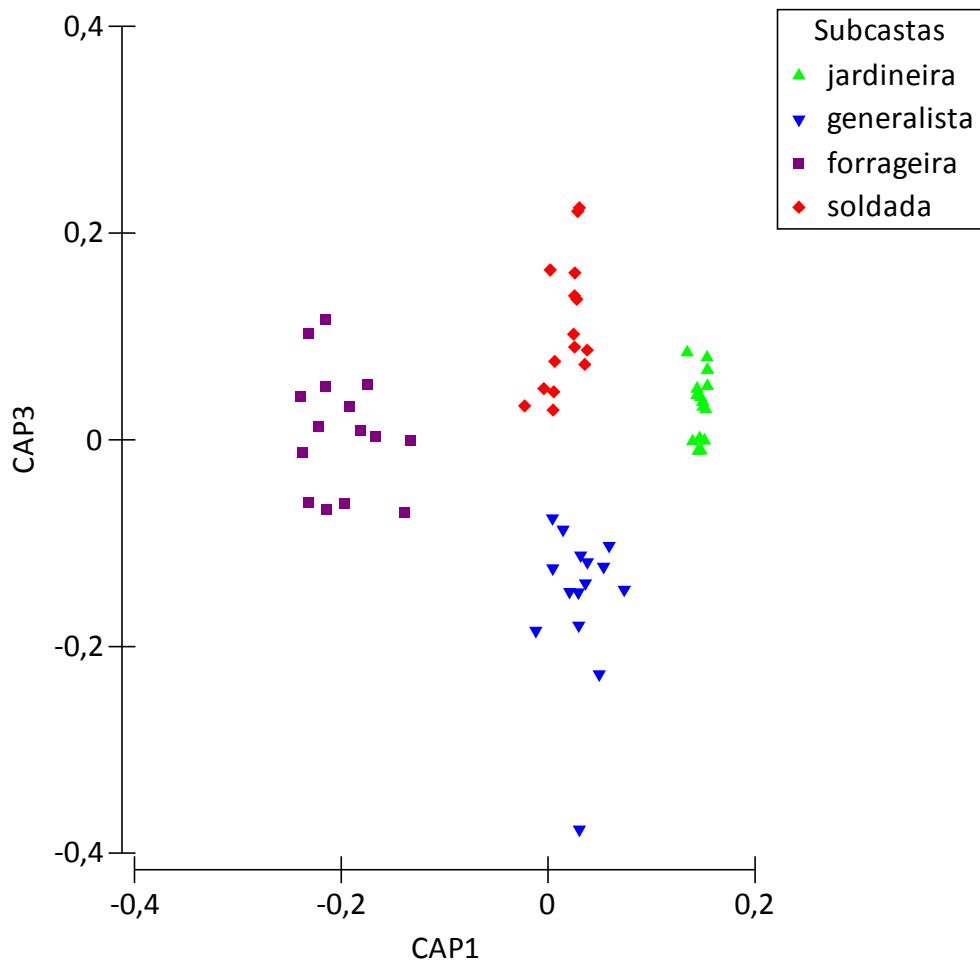


Figura 2 - Resultado da análise canônica das coordenadas principais (CAP) realizada com os hidrocarbonetos cuticulares das operárias das subcastas de *Atta sexdens*, colônia 1.



Tabela 1 - Valores médios e desvios padrões da proporção relativa dos hidrocarbonetos cuticulares de subcastas de *Atta sexdens*, colônia 1.

<b>Tempo de retenção (min.)</b>	<b>Hidrocarboneto</b>	<b>Jardineira</b>	<b>Generalista</b>	<b>Forrageira</b>	<b>Soldado</b>
27,02	<i>n</i> -C <sub>25</sub>	17,99 ± 4,35	15,55 ± 2,47	7,08 ± 1,82	21,9 ± 6,39
29,50	<i>n</i> -C <sub>26</sub>	1,18 ± 0,31	1,29 ± 0,20	0,58 ± 0,38	2,35 ± 0,72
32,03	<i>n</i> -C <sub>27</sub>	15,66 ± 0,72	19,14 ± 2,79	10,1 ± 2,66	22,1 ± 3,96
36,73	<i>n</i> -C <sub>29</sub>	2,73 ± 0,72	1,98 ± 0,41	0,66 ± 0,63	1,01 ± 0,24
40,26	3,7,11-TriMeC <sub>30</sub>	8,46 ± 1,12	5,73 ± 0,40	4,91 ± 1,51	6,97 ± 1,51
41,14	Z-C <sub>31</sub>	0,89 ± 0,29	0,71 ± 0,13	-	0,94 ± 0,21
41,47	9-MeC <sub>31</sub>	1,1 ± 0,24	0,85 ± 0,3	0,33 ± 0,32	-
41,97	3,5-DiMeC <sub>31</sub>	6,19 ± 0,82	4,18 ± 0,92	3,21 ± 1,36	5,07 ± 0,99
43,99	Não identificado (C <sub>32</sub> )	8,61 ± 1,37	6,64 ± 2,1	4,08 ± 0,71	4,81 ± 0,92
44,50	3,7,11-TriMeC <sub>32</sub>	16,3 ± 2,17	12,6 ± 2,44	8,56 ± 1,69	9,33 ± 1,58
45,36	<i>n</i> -C <sub>33</sub>	0,52 ± 0,29	-	-	-
45,85	4,8,12-TriMeC <sub>33</sub>	6,58 ± 1,11	5,5 ± 0,99	3,19 ± 0,56	3,49 ± 0,7
46,41	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>33</sub>	6,29 ± 0,94	5,2 ± 1,12	3,33 ± 0,75	3,76 ± 0,83
47,35	Não identificado (C <sub>34</sub> )	-	-	6,45 ± 3,9	-
48,26	3,5-DiMeC <sub>34</sub>	0,73 ± 0,29	0,58 ± 0,34	-	-
48,91	3,7 -DiMeC <sub>34</sub>	-	0,77 ± 0,52	-	0,57 ± 0,33
49,18	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>34</sub>	0,55 ± 0,55	1,15 ± 1,71	0,68 ± 0,14	-
49,89	3,7,11-TriMeC <sub>34</sub>	4,42 ± 0,8	3,43 ± 1,61	2,94 ± 0,59	2,55 ± 0,33
52,66	4,8,12-TriMeC <sub>35</sub>	0,32 ± 0,32	0,33 ± 0,37	-	-
53,89	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>35</sub>	-	1,15 ± 1,31	-	1,66 ± 1,35
59,04	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>37</sub>	1,43 ± 1,15	7,98 ± 3,03	20,5 ± 4,55	8,2 ± 4,67
65,62	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>39</sub>	-	5,26 ± 1,61	23,4 ± 3,69	5,32 ± 64

Tabela 2 - Distância entre os centroides dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares das subcastas de *Atta sexdens*, colônia 1.

<b>Jardineira</b>	<b>Jardineira</b>	<b>Generalista</b>	<b>Forageira</b>
<b>Generalista</b>	3,36		
<b>Forageira</b>	7,20	4,80	
<b>Soldada</b>	3,92	1,93	5,22

Tabela 3 - Distância euclidiana média dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares entre/dentro das subcastas de *Atta sexdens*, colônia 1.

	<b>Jardineira</b>	<b>Generalista</b>	<b>Forageira</b>	<b>Soldada</b>
<b>Jardineira</b>	1,81			
<b>Generalista</b>	3,99	2,58		
<b>Forageira</b>	7,46	5,35	2,28	
<b>Soldada</b>	4,40	3,09	5,65	2,31

## **Colônia 2**

As operárias da colônia 2 apresentaram a maior diversidade de hidrocarbonetos, totalizando 26 compostos (Tabela 4). Em relação ao perfil químico cuticular das subcastas, as generalistas e soldadas apresentaram maior número de compostos. Em seguida, em ordem de maior representatividade estão as jardineiras e forrageiras.

Concernente à proporção, as soldadas possuem maior proporção relativa de alcanos lineares quando comparada a outras subcastas, e as jardineiras possuem maior proporção relativa de alcanos ramificados, exceto para os dois últimos compostos da tabela, *a,b,c*-TriMeC<sub>37</sub> e *a,b,c*TtriMeC<sub>39</sub>. Nesses as forrageiras possuem proporções muito superiores, constituindo mais de 40 % da proporção total dos seus compostos.

O perfil de hidrocarbonetos cuticulares apresenta variação significativa em relação às subcastas, conferindo a essas uma identidade química cuticular (PERMANOVA, Pseudo-F = 54,208,  $p < 0,0001$ ) e (PERMANOVA, Pairwise tests,  $p < 0,0001$  para todas as

comparações). A análise canônica revela que 98,3% das operárias foram corretamente classificadas em suas subcastas (erro de 1,7%, uma generalista foi classificada como soldada). Contrapondo os resultados da colônia A1, os cálculos da distância euclidiana média apontam que a subcasta jardineira é a mais distante quimicamente (tabela 5).

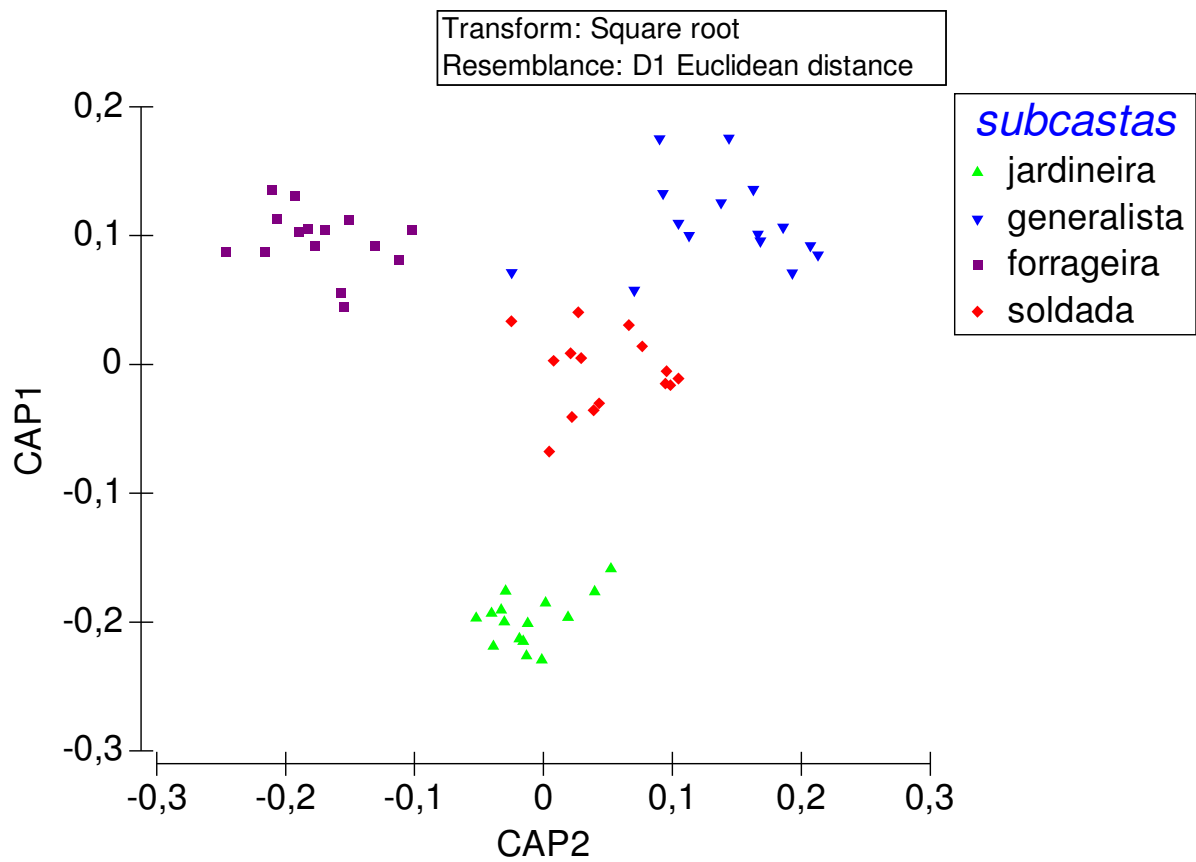


Figura 3 - Gráfico do resultado da análise canônica das coordenadas principais (CAP) realizada com os hidrocarbonetos cuticulares das operárias das subcastas de *A. sexdens*, Colônia 2.

Tabela 4 - Valores médios e desvios padrões da proporção relativa dos hidrocarbonetos cuticulares de subcastas de *Atta sexdens*, Colônia 2.

Tempo de retenção	Hidrocarboneto	Jardineira	Generalista	Forrageira	Soldada
10,31	Z,Z-C <sub>19</sub>	1.06 ± 1.04	4.17 ± 1.04	-	-
21,01	Z-C <sub>23</sub>	-	1.53 ± 0.85	-	0,77 ± 0,79
27,05	<i>n</i> -C <sub>25</sub>	7,41 ± 2.06	6,45 ± 1,51	6,24 ± 2,12	7,5 ± 2,94
29,46	<i>n</i> -C <sub>26</sub>	0.37 ± 0.37	0,47 ± 0,3	0,37 ± 0,37	0,95 ± 0,21
31,93	<i>n</i> -C <sub>27</sub>	14 ± 4.9	13,4 ± 2,6	14 ± 2,56	18,6 ± 4,51
34,31	<i>n</i> -C <sub>28</sub>	-	-	-	0,5 ± 0,38
36,63	<i>n</i> -C <sub>29</sub>	4.77 ± 1.9	4,8 ± 1,46	4,14 ± 2,04	6,53 ± 3,09
39,63	Não identificado (C <sub>30</sub> )	0.9 ± 0.4	0,55 ± 0,37	-	0,58 ± 0,36
40,16	3,7,11-TriMeC <sub>30</sub>	9.19 ± 1.74	5,63 ± 0,86	4,4 ± 0,95	7,87 ± 1,68
41,05	Z-C <sub>31</sub>	1.24 ± 0.94	-	-	-
41,37	9-MeC <sub>31</sub>	1.64 ± 0.4	1,05 ± 0,32	-	0,86 ± 0,44
41,87	3,5-DiMeC <sub>31</sub>	6.54 ± 1.49	3,8 ± 0,58	2,48 ± 0,88	5,38 ± 1,39
43,24	13-MeC <sub>32</sub>	0.5 ± 0.3	-	-	-
43,83	Não identificado (C <sub>32</sub> )	11.5 ± 3.48	7,32 ± 1,53	3,59 ± 0,77	6,49 ± 1,86
44,38	3,7,11-TriMeC <sub>32</sub>	17 ± 2.44	11 ± 1,72	6,93 ± 1,39	12,3 ± 2,59
45,37	<i>n</i> -C <sub>33</sub>	0.96 ± 0.52	-	-	-
45,73	4,8,12-TriMeC <sub>33</sub>	7.89 ± 2.48	5,28 ± 0,96	2,55 ± 0,61	4,61 ± 1,34
46,40	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>33</sub>	6.35 ± 1.31	4,06 ± 0,54	2,52 ± 0,61	4,74 ± 1,34
47,45	Não identificado (C <sub>34</sub> )	-	-	2,61 ± 1,75	-
48,19	3,5-DiMeC <sub>34</sub>	0.99 ± 0.36	0,91 ± 0,21	-	0,59 ± 0,34
49,03	3,7 -DiMeC <sub>34</sub>	1.28 ± 0.66	1,2 ± 0,22	0,31 ± 0,3	0,87 ± 0,34
49,72	3,7,11-TriMeC <sub>34</sub>	4.14 ± 1.06	3,49 ± 0,51	2,1 ± 0,44	3,26 ± 0,85
52,46	4,8,12-TriMeC <sub>35</sub>	-	0,51 ± 0,28	-	0,41 ± 0,36
54,01	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>35</sub>	-	2,91 ± 1,35	7,02 ± 1,11	3,86 ± 1,81
59,13	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>37</sub>	2.2 ± 2.12	12,6 ± 3,91	22,8 ± 3,27	8,99 ± 3,31
65,77	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>39</sub>	-	8,92 ± 3,62	18 ± 2,9	4,36 ± 1,2

Tabela 5 - Distância entre os centroides dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares das subcastas de *Atta sexdens*, Colônia 2.

	Jardineira	Generalista	Forageira
<b>Jardineira</b>			
<b>Generalista</b>	4,87		
<b>Forageira</b>	7,38	4,11	
<b>Soldada</b>	4,14	2,58	4,18

Tabela 6 - Distância euclidiana média dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares entre/dentro das subcastas de *Atta sexdens*, Colônia 2.

	Jardineira	Generalista	Forageira	Soldada
<b>Jardineira</b>	2,85			
<b>Generalista</b>	5,45	2,16		
<b>Forageira</b>	7,74	4,52	1,91	
<b>Soldada</b>	4,87	3,46	4,68	2,50

### Colônia 3

A cutícula das operárias dessa colônia é composta por 24 hidrocarbonetos (Tabela 7), desses, 20 foram encontrados nas forrageiras, 19 nas generalistas e soldadas e 18 nas jardineiras. Diferentemente das outras duas colônias, não há um padrão entre subcastas e a concentração relativa dos alcanos lineares e ramificados. Tampouco foi verificada a alta concentração dos trimetialcanos *a,b,c*-TriMeC<sub>37</sub> e *a,b,c*-TriMeC<sub>39</sub> nas forrageiras, que juntos correspondem a apenas 14,7 % da concentração relativa total de compostos dessa subcasta.

Os dados da análise canônica revelam que 100 % das operárias foram classificadas corretamente em suas subcastas e que de uma forma geral, todas são quimicamente diferentes (PERMANOVA, Pseudo-F = 16,643,  $p < 0,0001$ ). As comparações feitas pelo teste *Pairwise* resultaram no valor de  $p < 0,0001$ , exceto para jardineira vs. generalista ( $p > 0,0002$ ).

Concernente à distância química entre as subcastas, o cálculo da distância entre os centroides (Tabela 8) e distância euclidiana média (Tabela 9) mostra que as combinações que envolvem as soldadas apresentam os maiores valores.

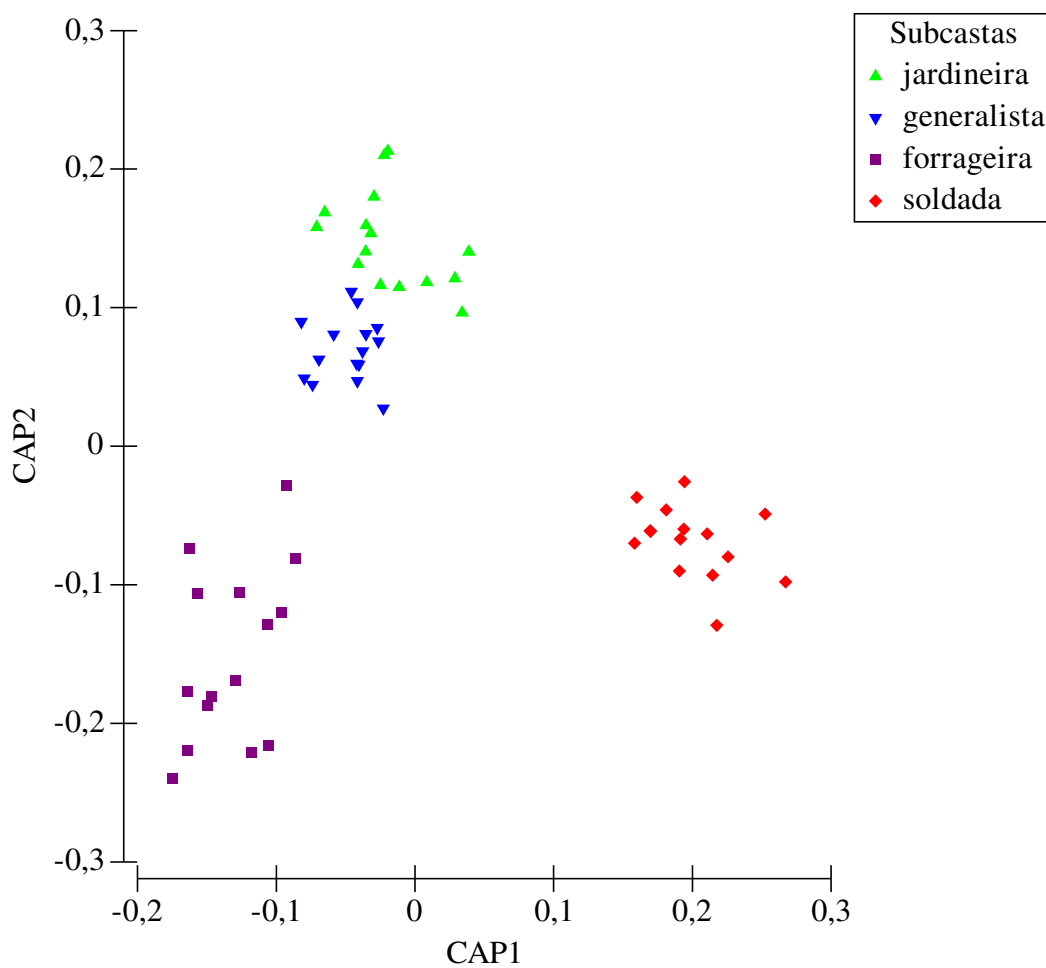


Figura 4 - Resultado da análise canônica das principais coordenadas (CAP) realizada com os hidrocarbonetos cuticulares das operárias das subcastas de *A. sexdens*, Colônia 3.

Tabela 7 - Valores médios e desvio padrão da proporção relativa dos hidrocarbonetos cuticulares de subcastas de *Atta sexdens*, Colônia 3.

<b>Tempo de retenção (min.)</b>	<b>Hidrocarboneto</b>	<b>Jardineira</b>	<b>Generalista</b>	<b>Forageira</b>	<b>Soldada</b>
6,98	Não identificado	0,46 ± 1,80	-	-	13,3 ± 16,9
26,78	<i>n</i> -C <sub>25</sub>	14,1 ± 5,94	8,8 ± 2,14	7,67 ± 2,82	11,1 ± 3,8
29,36	<i>n</i> -C <sub>26</sub>	0,87 ± 0,63	0,56 ± 0,44	0,51 ± 0,39	1,84 ± 0,77
31,16	<i>Z,Z</i> -C <sub>27</sub>	-	-	-	0,54 ± 0,57
31,78	<i>n</i> -C <sub>27</sub>	13,63 ± 5,56	9,46 ± 3,24	6,35 ± 1,93	8,54 ± 3,35
34,78	<i>n</i> -C <sub>28</sub>	-	-	-	0,64 ± 0,47
36,49	<i>n</i> -C <sub>29</sub>	3,46 ± 1,67	2,25 ± 0,76	1,86 ± 0,55	1,18 ± 0,78
39,48	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>30</sub>	0,55 ± 0,54	1,04 ± 0,52	1,33 ± 0,34	-
40,00	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>30</sub>	8,01 ± 1,76	9,04 ± 1,84	9,4 ± 1,86	9,95 ± 2,17
40,90	<i>Z</i> -C <sub>31</sub>	0,88 ± 0,62	0,41 ± 0,36	0,57 ± 0,41	-
41,22	9-MeC <sub>31</sub>	1,12 ± 0,68	1,43 ± 0,38	1,92 ± 0,65	1,2 ± 0,42
41,71	3,5-DiMeC <sub>31</sub>	4,92 ± 1,17	5,24 ± 0,93	5,08 ± 0,94	6,79 ± 1,49
43,09	13-MeC <sub>32</sub>	-	-	0,55 ± 0,36	-
43,72	Não identificado (C <sub>32</sub> )	11,1 ± 2,24	12,9 ± 1,76	11,2 ± 1,77	6,35 ± 1,91
44,22	3,7,11-TriMeC <sub>32</sub>	18,2 ± 4,09	20,3 ± 2	18 ± 2,07	15 ± 3,12
45,55	<i>n</i> -C <sub>33</sub>	6,9 ± 1,76	7,75 ± 0,93	6,93 ± 1,28	5,13 ± 1,86
46,10	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>33</sub>	5,93 ± 1,49	6,33 ± 0,97	5,14 ± 0,55	6,01 ± 1,26
47,90	Não identificado (C <sub>34</sub> )	0,55 ± 0,44	0,9 ± 0,26	0,93 ± 0,41	-
48,83	3,5-DiMeC <sub>34</sub>	1 ± 0,95	1,15 ± 0,25	0,98 ± 0,47	0,57 ± 0,44
49,51	3,7,11-TriMeC <sub>34</sub>	4,95 ± 1,3	5,75 ± 1,03	4,17 ± 1,6	4,34 ± 0,97
52,24	4,8,12-TriMeC <sub>35</sub>	-	0,39 ± 0,34	-	0,77 ± 0,6
53,56	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>35</sub>	-	-	2,63 ± 1,55	-
58,78	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>37</sub>	3,81 ± 3,83	4,52 ± 2,81	9,59 ± 3,85	4,16 ± 3,07
65,27	<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>39</sub>	-	1,8 ± 1,31	5,19 ± 2,3	2,41 ± 1,74

Tabela 8 - Distância entre os centroides dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares das subcastas de *Atta sexdens*, Colônia 3.

	<b>Jardineira</b>	<b>Generalista</b>	<b>Forageira</b>
<b>Jardineira</b>			
<b>Generalista</b>	1,95		
<b>Forageira</b>	3,58	2,40	
<b>Soldada</b>	3,79	3,62	4,25

Tabela 9 - Distância euclidiana média dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares entre/dentro das subcastas de *Atta sexdens*, Colônia 3.

	<b>Jardineira</b>	<b>Generalista</b>	<b>Forageira</b>	<b>Soldada</b>
<b>Jardineira</b>	3,05			
<b>Generalista</b>	3,11	1,86		
<b>Forageira</b>	4,40	3,12	2,31	
<b>Soldada</b>	5,12	4,62	5,25	4,17



## DISCUSSÃO

Martin e MacConnell (1970) foram os pioneiros a abordarem a composição de hidrocarbonetos de cutícula em formigas, coincidentemente eles trabalharam com três formigas cortadeiras, *A. colombica*, *A. sexdens* e *A. cephalotes*. Quatro décadas após, um segundo trabalho do mesmo tema foi publicado por Marinho *et al.* (2008), dessa vez utilizando apenas a formiga *A. sexdens*. Esses dois trabalhos se complementam, pois o primeiro reporta apenas os alcanos ramificados da forma que o outro apenas os lineares e ambos serão utilizados para começar a discussão com os dados obtidos neste trabalho.

Martin e MacConnell (1970) identificaram seis trimetialcanos divididos em duas séries homólogas, 3,7,11-( $C_{34}H_{72}$ ,  $C_{36}H_{76}$  e  $C_{38}H_{80}$ ) e 4,8,12-( $C_{35}H_{72}$ ,  $C_{37}H_{76}$ ,  $C_{39}H_{80}$ ). Houve certa semelhança entre esses resultados e aqueles apresentados nesse capítulo em relação à diversidade de compostos, por exemplo, ambas as séries foram encontradas neste trabalho, entretanto houve variação na cadeia carbônica onde a séries ocorreram.

Em relação aos alcanos lineares, houve grande semelhança entre os resultados obtidos por Marinho *et al.* (2008) e aqueles deste capítulo. No entanto, sabe-se que os alcanos lineares com cadeia carbônica entre 25 e 35 átomos estão amplamente bem representados na cutícula de formigas (Martin & Drijfhout, 2008), não apresentando variações de especificidade em nível de espécie (Wilgenburg *et al.* 2011), porém, esses compostos estão associados a indução de esterilidade por parte das rainhas em relação as operárias (Van Oystaeyen *et al.* 2014). Ao analisarmos a concentração relativa dos alcanos lineares entre os dois trabalhos, percebemos que há igualdade entre aqueles mais representativos: *n*-C27, *n*-C25 e *n*-C29, respectivamente.

Os resultados desse estudo mostram uma clara discretização das quatro subcastas morfológicas pelos hidrocarbonetos cuticulares, conferindo a essas uma identidade química cuticular. Isso reforça outros estudos que evidenciaram a plasticidade desses compostos em relação às atividades desenvolvidas pelas operárias, como no caso das formigas *Camponotus*

*textor* (Campos *et al.* 2012), *Dinoponera quadriceps* (Nascimento *et al.* 2012), *Pogonomyrmex barbatus* (Wagner *et al.* 1998), *Myrmicaria eumenoides* (Kaib *et al.* 2000) e nas abelhas *Melipona marginata* (Ferreira-Caliman *et al.* 2010), *Apis mellifera* (Kather *et al.* 2011), dentre outros.

Acredita-se que essa discretização e consequente aquisição de uma assinatura química estejam intimamente associadas à divisão de trabalho em insetos sociais, entretanto poucos estudos mostram o papel efetivo dos hidrocarbonetos nessa área. Os indivíduos de uma colônia não obedecem a um controle central para alocar operárias em uma determinada tarefa e dessa forma elas poderiam utilizar os CHCs como uma pista de decisão entre desenvolver ou não uma atividade (Howard & Blomquist, 2005).

Greene e Gordon (2003) publicaram um trabalho com a formiga colheitadeira, *Pogonomyrmex barbatus*, onde mostraram que na entrada do ninho, a presença dos hidrocarbonetos de cutícula das operárias que patrulham a trilha de forragem incita a atividade de forrageio em outras operárias. Quando uma formiga encontra uma companheira de ninho, ela tem informações a respeito das tarefas que a outra desempenha e assim essas informações são usadas nas decisões de alocação de tarefas dentro de uma colônia, formando uma rede de interações que regulam o comportamento social (Greene e Gordon, 2003).

Uma observação importante dos resultados obtidos no nosso trabalho é o distanciamento das subcastas de acordo com o perfil químico. Das três colônias analisadas, nenhuma indicou as generalistas como as mais distantes quimicamente, isso pode ser explicado porque essa subcasta possui um tamanho intermediário, e consequentemente desenvolve um repertório comportamental maior. Segundo Wilson (1980), em *A. sexdens*, as classes mais especializadas são aquelas que possuem a cápsula cefálica menor que 1,2mm e maior que 2,4mm, excluindo assim as generalistas, que em analogia às aténeas monomórficas, exibem características morfológicas mais primitivas.

Também há questões levantadas a respeito da proporção de alcanos lineares entre as subcastas, e esperaria-se encontrar uma maior proporção deles nas forrageiras, visto que essas permanecem mais tempo expostas ao sol do que as outras classes de operárias, e a função primária dos CHCs é a proteção contra dessecação e devido a pouca variação de especificidade dos alcanos em insetos sociais em geral, eles não deveriam atuar efetivamente nos processos de reconhecimento intra- e interespecíficos (Greene & Gordon 2003; Howard & Blomquist 2005; Wilgenburg *et al.* 2011). Entretanto, para as colônias de laboratório (Colônia 1 e 2) os soldados apresentam uma maior proporção de alcanos lineares e para as operárias da colônia 3 não foi observado nenhum padrão para essa distribuição.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Caliman-Ferreira, M. J.; Nascimento, F. S.; Turatti, I. C.; Mateus, S.; Lopes, N. P.; Zucchi, R. 2010. The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. *Journal of Insect Physiology*, **56**: 800-804.
- Campos, M. C. G. C.; Campos, M. L. G.; Turatti, I. C.; Nascimento, F. S. 2012. Cuticular hydrocarbon variation of Castes and Sex in the Weaver Ant *Camponotus textor* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, **59**: 1025-1035.
- Della-Lucia, T. M. C.; Folwer, H. G.; Araújo, M. S. 1993. Castas de formigas cortadeiras. In Della-Lucia, T. M. C. (Ed). *As Formigas Cortadeiras*. Folha de Viçosa, Viçosa, 262 pp.
- Kaib, M.; Eisermann, E.; Schoeters, E.; Billen, J.; Franke, S.; Francke, W. 2000. Task-related variation of postpharyngeal and cuticular hydrocarbon composition in the ant *Myrmecaria eumenoides*. *J Comp Physiol A*, **186**: 939-948.
- Kather, R.; Drijfhout, F.; Martin, S. 2011. Task group differences in cuticular lipids in the honey bee *Apis mellifera*. *J Chem Ecol*, **37**(2): 205-212.
- Greene, M. J.; Gordon, . M. 2003. Cuticular hydrocarbons inform task decisions. *Nature*, 423: 32.
- Howard, R. W. & Blomquist, G. J. 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.*, **50**: 371–392.
- Marinho, G. C. S.; Della-Lucia, M. T. C.; Ribeiro, M. M. R.; Magalhães, S. T. V.; Guedes, R. N. C. & Jham, G. N. 2008. Interference of b-Eudesmol in nestmate recognition in *Atta sexdens rubrofilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Bulletin of Entomological Research*, **98**: 467-473.
- Martin, M.M.; MacConnel, J. G. 1970. The alkanes of *Atta colombica*. *Tetrahedron*. 26: 307-319.
- Martin, S.; Drijfhout, F. A review of ant cuticular hydrocarbons. 2009. *J Chem Ecol*, **32**: 1151-1161.
- Mehdiabadi, N. J.; Schultz, T. R. 2010. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Myrmecological news*, **13**: 37-55.

- Nascimento, F. S.; Souza, I. S. A.; Tannure-Nascimento, I.; Dantas, J.O. 2012. Social facilitation and food partitioning in the queenless ant *Dinoponera quadriceps* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Natural History*, **46**: 1959-1967.
- Wagner, D.; Brown, M. J.; Broun, P.; Cuevas, W.; Moses, L.; Chao, D. L.; Gordon, D. Task-related differences in cuticular hydrocarbon composition of harvester ants, *Pogonomyrmex barbatus*. *J Chem Ecol*, **24**: 2021:2037.
- Wilson, E. O. 1980. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: *Atta*). I: The overall pattern in *A. Sexdens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **7**: 143-156.

## Capítulo 2

**Influência do substrato foliar no perfil de hidrocarbonetos cuticulares das operárias de *Atta sexdens***

## **RESUMO**

O reconhecimento de companheiras de ninho é um fator primordial na evolução dos himenópteros eussociais e está intimamente associado aos hidrocarbonetos de cutícula que atuam como mensageiros químicos e codificam informações desde o nível colonial até individual. Esses compostos são produzidos por células dérmicas e a sua composição recebe influência de fatores tanto endógenos quanto exógenos, o que a torna dinâmica principalmente em relação às variáveis ambientais mais particulares da espécie. Em formigas cortadeiras, o extenso processamento do substrato foliar pelas operárias o sugere como principal fator ambiental influente no perfil de hidrocarbonetos cuticulares e assim, esse estudo foi motivado pela investigação entre essa relação. Foram identificados 27 hidrocarbonetos, divididos em três classes de compostos sendo que a dos hidrocarbonetos ramificados é a mais representativa, especificamente os trimetialcanos. Os resultados obtidos mostram que o substrato foliar tem influência sobre a composição de hidrocarbonetos cuticulares das operárias e conseqüentemente, colônias que tiveram acesso ao mesmo recurso apresentam uma composição química cuticular mais semelhante em relação àquelas que tiveram acesso a um recurso diferente. Complementarmente, os testes comportamentais mostram que, na presença de uma intrusa, as operárias residentes são mais agressivas em relação às coespecíficas que utilizaram outro tipo de substrato foliar.

## **ABSTRACT**

Nestmate recognition is a key feature on the evolution of social insects and it is closely associated with cuticular hydrocarbons that act as chemical messengers encoding information about identify of groups. These compounds are produced by dermic cells and its composition is influenced by both endogenous and exogenous factors which make it subject especially to the most particular environmental variables of the species. In leafcutter ants the extensive processing of foliar substrate by workers suggests it as the primary environmental factor influencing on cuticular hydrocarbons profile and thus this study was motivated by the investigation between this relation. It was identified 27 hydrocarbons separated in three classes of compounds and the branched hydrocarbons as the major one, especially trymethialkanes. The results show that foliar substrate has influence on the composition of cuticular hydrocarbons and concomitantly affect the interspecific recognition, thus colonies that had access to the same substrate has similar cuticular composition comparing to those which did not. Additionally, behavior tests show that in the presence of a conspecific intruder the workers tend to be much more aggressive in relation to those who had accesses to a different foliar substrate.



## INTRODUÇÃO

A habilidade de discriminação entre membros e não membros de uma colônia permite que atos altruístas sejam direcionados a indivíduos geneticamente relacionados, além de agir como um mecanismo de defesa contra parasitas e competidores intra- e interespecíficos, sendo assim um fator chave para a evolução da eussocialidade (Vander Meer & Morel, 1998). É amplamente aceito que nos insetos sociais as interações de reconhecimento são baseadas em pistas odoríferas que compõem a identidade química da colônia, e que os hidrocarbonetos de cutícula são os principais compostos químicos envolvidos nesses processos, atuando como mensageiros químicos que transmitem tais individualidades (Howard & Blomquist 2005; Blomquist 2010).

Os hidrocarbonetos são sintetizados por células da derme chamadas de oenócitos e sabe-se que a composição desses compostos recebe influência tanto genética quanto ambiental, sujeitando assim mudanças temporais de acordo com variações sazonais, de nidificação, recurso alimentar, presença de simbioses e patógenos, dentre outros (Vander Meer & Morel, 1998; Nielsen *et al.* 1999; Buczwoski *et al.* 2005; Ichinose *et al.* 2009; Richard & Hunt, 2013).

Em formigas cortadeira, ambas operárias e fungo simbionte, se alimentam principalmente da glucose gerada pela degradação do amido proveniente do tecido vegetal coletado pelas formigas (Siqueira *et al.* 1998; Silva *et al.* 2003). O intenso processamento do material vegetal pelas operárias associado à necessidade vital do fungo por esse recurso sugere que o substrato foliar é o principal fator ambiental influente no perfil de hidrocarbonetos cuticulares dessa formiga. Sendo assim, esse estudo objetivou analisar as mudanças temporais na composição química cuticular juntamente com interações agonísticas entre colônias que tinham a dieta controlada em condições de laboratório.

## **METODOLOGIA**

### **Manutenção Das Colônias Em Laboratório**

As colônias mantidas em laboratório foram inicialmente coletadas na natureza durante a fase inicial de desenvolvimento (aproximadamente três meses de idade), e estavam naturalmente separadas por no mínimo 50 quilômetros de distância. Duas destas foram coletadas pela equipe técnica do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP de Rio Claro e pelo Laboratório de Insetos Sociais-Praga (LISP) da UNESP de Botucatu. A outra foi estabelecida através da coleta da rainha após a revoada nupcial que ocorreu na cidade de Ribeirão Preto.

As colônias foram acondicionadas em recipientes plásticos interconectados por tubos e tinham capacidade entre 1 e 10 litros que foram utilizados pelas formigas para estabelecer a área de forragem, potes de fungo e lixo. Foram oferecidas diariamente folhas frescas de roseira, hibisco, resedá, jambolão e pingo de ouro, além de aveia e farinha de milho, seguindo a preferência alimentar da espécie. A temperatura e umidade do laboratório foram mantidas em torno de 25°C e 75%, respectivamente, segundo as recomendações de Della-Lucia (1993).

Os experimentos foram realizados quando as colônias já possuíam mais de dois anos de vida. As colônias Col-A1 e Col-B1 possuíam aproximadamente cinco litros de fungo, enquanto as colônias Col-A2 e Col-B2 dois litros e meio.

### **Grupos De Dieta e Teste Comportamental**

O experimento contava com quatro colônias divididas em dois grupos alimentares, grupo-A e grupo-B, que durante 120 dias tiveram suas alimentações controladas da seguinte forma: Nos primeiros sessenta dias (FASE I) as colônias do grupo-A receberam principalmente folhas e pétalas de roseira *Rosa* sp., enquanto as colônias do grupo B foram alimentadas com folhas de resedá *Lagerstroemia* sp. A partir do 61º dia (FASE II) todas as colônias foram alimentadas com folhas de *Hibiscus* sp.

Ao término de cada fase, foram conduzidos testes comportamentais que envolviam a introdução de uma forrageira não companheira de ninho na área de forrageamento de uma colônia teste, a fim de escalonar a agressividade das formigas residentes em relação às introduzidas. Companheiras de ninho (n= 10) também foram introduzidas como controle. As introduções tinham duração de dois minutos, e os atos comportamentais foram registrados com base em uma escala 1 a 5 (modificado de Martin *et al.* 2008), onde:

- 1, antenar – uma ou mais formigas residentes antenam a formiga introduzida;
- 2, abertura de mandíbula – uma ou mais formigas residentes adotam postura de alarme e/ou vão em direção da formiga introduzida com as mandíbulas abertas;
- 3, apreensão – uma ou mais formigas fecham suas mandíbulas em alguma região do corpo da introduzida, imobilizando-a.
- 4, mordida – uma ou mais formigas mordem de forma intensa alguma região do corpo da introduzida;
- 5, briga – uma ou mais formigas residentes agridem intensa e reciprocamente a formiga introduzida. Nesse comportamento pode haver danos para as ambas as partes, pois há a possibilidade de perda de apêndices e/ou gáster, podendo levar a morte.

Com base na escala supracitada, foi possível medir o nível de agressão das introduções através do cálculo de índices de agressividade (I.A) (modificado de Martin (2008)), onde:

I.A

= soma das interações com escores 3, 4 ou 5

---

soma total de todas as interações

Testes preliminares foram conduzidos utilizando tinta para marcação das formigas introduzidas, entretanto essa técnica não demonstrou viabilidade para o estudo porque as formigas

apresentaram alta sensibilidade para detecção da tinta, então optou-se por remover o tarso de uma das pernas traseiras, o qual não mostrou afetar o desempenho da formiga e permitiu distingui-la das outras.

As introduções foram realizadas em um sistema de rodízio para diminuir o estresse das colônias pela manipulação experimental e logo após a coleta dos dados a formiga introduzida era retirada da área de forragem da colônia teste. É importante dizer que as quatro colônias serviam tanto como colônias-fonte (origem das formigas introduzidas não companheiras de ninho) como colônias-testes, assim, foi possível estabelecer as 16 combinações de introduções.

### **Análises Químicas Cuticulares**

Análises químicas cuticulares foram realizadas ao fim de cada fase para obtenção dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares das colônias. Para tal, operárias forrageiras ( $n= 15$  por colônia/fase) foram coletadas com auxílio de uma pinça desodorizada em solvente apolar hexano e armazenadas em *freezer* com temperatura em torno de 4°C até o procedimento da extração dos compostos.

A extração ocorreu pela imersão de cada indivíduo em 130 microlitos de hexano por dois minutos. Desses, 1,5 microlitros foi injetado em um sistema de cromatografia a gás acoplado à Espectrometria de Massa (CG-MS) SHIMADZU, modelo GCMS-QP2010, equipado com a coluna capilar de silicone de 25m e hélio como gás de arraste a taxa de 1 ml/min. O método utilizado contava com duas rampas de temperatura, sendo a primeira 150°-280°C a uma taxa de 3°C/min (temperatura máxima mantida por dez minutos) e a segunda 280°-300°C a uma taxa de 10°C/min (temperatura máxima mantida por quinze minutos).

Para identificação de alguns compostos que possuíam o espectro incompleto devido sua baixa concentração, foi preparado uma amostra concentrada ou *pool* contendo 20 operárias/colônia imersas em 4 mililitros de hexano por 2 minutos. O solvente contendo os

compostos foi evaporado e ressuspensos em 50 microlitros para injeção no GC-MS. A identificação contou também com o auxílio de um padrão de hidrocarbonetos alcanos com cadeia de 21 a 40 carbonos.

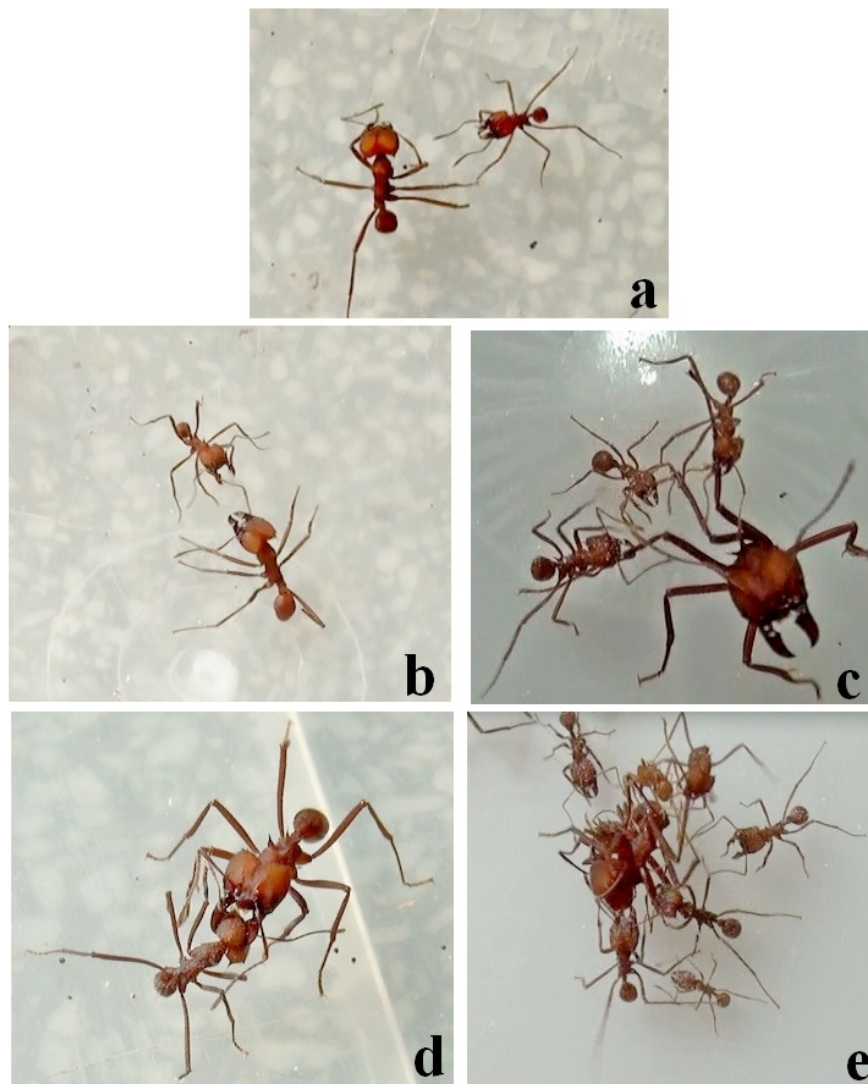


Figura 1- atos comportamentais registrados durante os testes de agressão entre colônias de *Atta sexdens*. A, antenação; b, mandíbula aberta; c, apreensão; d, mordida; e, briga.

### **Análise estatística**

Para os testes comportamentais, a frequência das interações nas duas fases foi comparada utilizando o modelo linear generalizado (MLG) e os índices de agressão de ambas as fases foram

comparados usando teste não paramétrico Mann-Whitney (*U*). Essas análises foram realizadas utilizando o programa Statistica 6.0 (StatSoft).

Para análise estatística dos dados químicos, os compostos que estavam ausentes em mais de sete indivíduos de um grupo ou que contribuíam em menos de 0,5 % no total de compostos foram excluídos das análises. Foi realizada uma análise de variância PERMANOVA com 9999 permutações, onde os dados foram previamente normalizados e transformados por raiz quadrada e a matriz de semelhança (distância Euclidiana) calculada. Testes *post-hoc* (PERMANOVA, *pair-wise tests*) foram utilizados para comparação dos perfis químicos cuticulares em cada uma das fases. A distância média dos centroides dos perfis químicos também foi calculada. Essas análises foram realizadas utilizando o programa Primer 6 (Primer-e Ltda).

## RESULTADOS

### Testes comportamentais

Os resultados obtidos mostram que formigas residentes foram muito mais agressivas em relação às coespecíficas que tiveram acesso a um substrato foliar diferente ( $U= 5$ ,  $p < 0.0045$ ). Os índices de agressão das introduções envolvendo colônias do grupo-A vs. grupo-B variaram entre 0,5% e 0,7% na fase-I, enquanto que na fase-II o escore mais alto foi 0,47% (Figura 1). De uma forma geral, houve uma redução na agressividade para todas as colônias na fase-II, porém entre as colônias de grupos diferentes essa perda foi mais acentuada (aproximadamente 25%) enquanto que para as colônias que tiveram a dieta igualada durante todo o experimento, a redução foi de apenas 8%.

Em relação às categorias de agressão que foram escalonadas, a frequência de mandíbulas abertas, mordidas e brigas foram significativamente diferentes quando comparadas entre as fases, e todas ocorreram com maior frequência na fase-I (Figura 3), (mandíbulas abertas GLM,  $p < 0,00007$ ; mordidas GLM,  $p < 0,0026$ ; brigas GLM,  $p < 0,0259$ , intervalo de confiança a 95%). Em contraste, apreensão não mostrou diferença significativa entre as fases e antenação ocorreu em todas as introduções, como esperado. (GLM,  $p=0,31$ ).

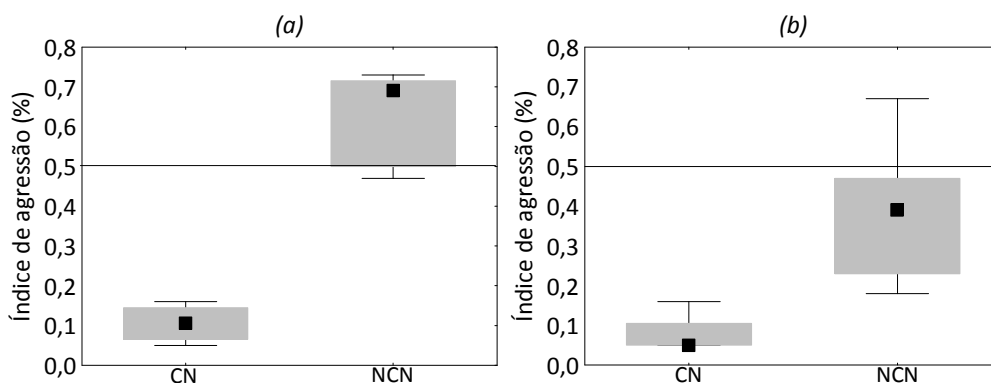


Figura 2. Frequência dos índices de agressão entre colônias do Grupo-A vs. Grupo-B em (a) Fase I e (b) Fase II. CN – companheiras de ninho; NCN – não companheiras de ninho.

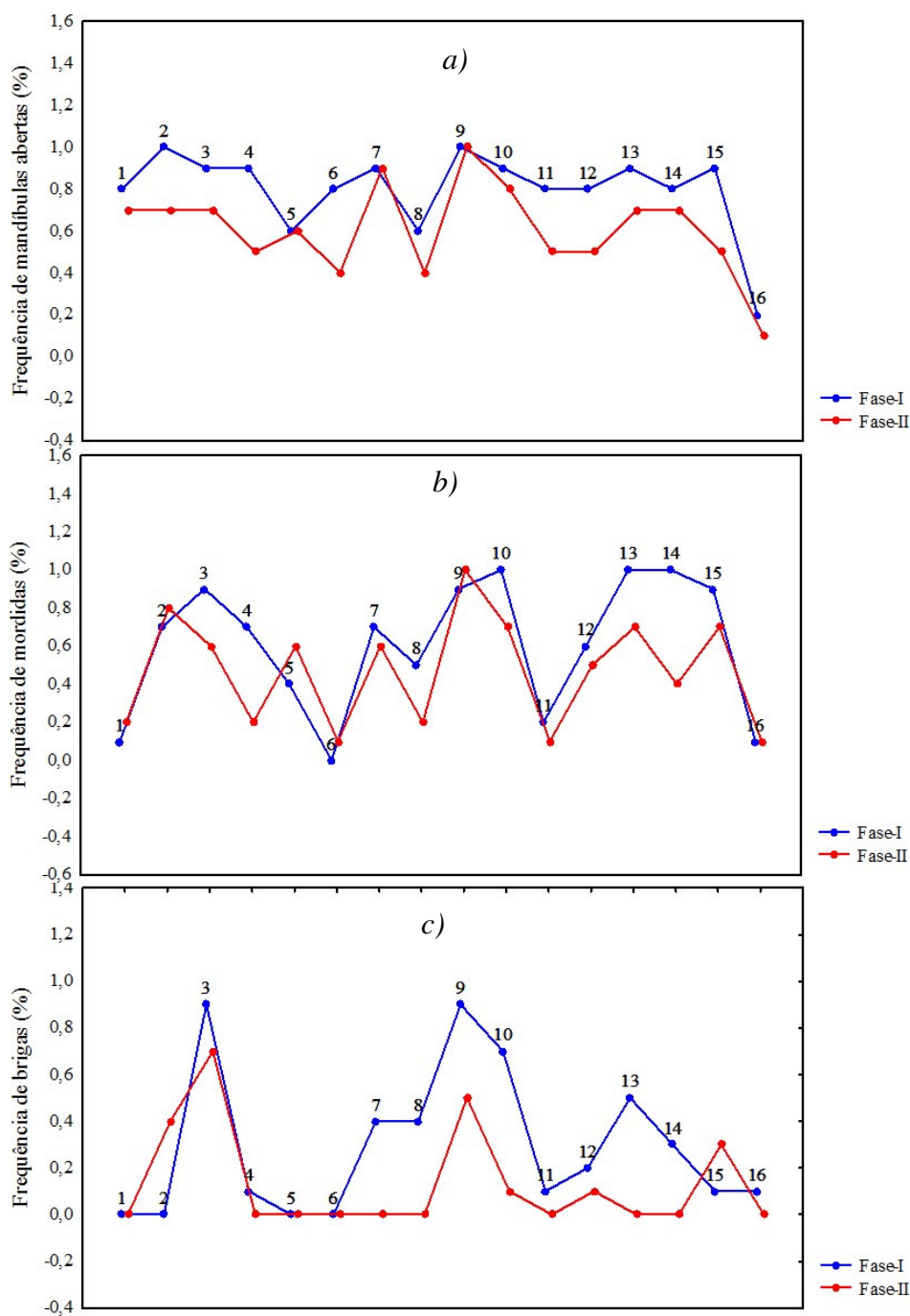


Figura 3. Frequência das interações (a) mandíbula aberta, (b) mordida e (c) briga nas duas fases do experimento. Cada ponto no gráfico representa um encontro: 1 (A1 vs. A1), 2 (A1 vs. A2), 3 (A1 vs. B1), 4 (A1 vs. B2), 5 (A2 vs. A1), 6 (A2 vs. A2), 7 (A2 vs. B1), 8 (A2 vs. B2), 9 (B1 vs. A1), 10 (B1 vs. A2), 11 (B1 vs. B1), 12 (B1 vs. B2), 13 (B2 vs. A1), 14 (B2 vs. A2), 15 (B2 vs. B1) e 16 (B2 vs. B2).



### **Análises químicas**

Os compostos encontrados na cutícula de *A. sexdens* são principalmente hidrocarbonetos, os quais possuem cadeias carbônicas que variam entre 19 e 40 átomos, classificados como alcenos, alcanos lineares, metilados, dimetilados e trimetilados (Tabela 1). De uma forma geral, foram encontradas diferenças quantitativas e qualitativas entre as colônias (Pseudo-F= 14.563 P < 0.0001). Esses perfis sofreram mudanças temporais, notando-se diferença significativa entre as fases (comparações pair-wise Col A1 P < 0.0001, Col A2 P < 0.0003, Col B1 P < 0.0001, Col B2 P < 0.0017).

Os trimetialcanos compõem a classe de hidrocarbonetos mais abundante nessa espécie. Na colônia A1, o composto majoritário na primeira fase do experimento foi 3,7,11-TriMetilC<sub>32</sub> sendo substituído na segunda fase pelo *a,b,c*-TriMeC<sub>39</sub>. O composto *a,b,c*-TriMeC<sub>37</sub> foi majoritário em ambas as fases da colônia B2, e também na primeira fase da colônia A2, sendo substituído por *a,b,c*-TriMeC<sub>39</sub>. Para Colônia 2, o alcano linear *n*-C<sub>27</sub> foi o mais representativo na fase-I e o *a,b,c*-TriMeC<sub>37</sub> na fase-II (Tabela 1).

Os cálculos da distância euclidiana assim como a distância entre os centroides (Figura 5) mostram que as colônias na Fase-I são mais diferentes quimicamente do que na Fase-II. As combinações que envolvem a Colônia 2 apresentam maiores valores para ambos os cálculos, dessa forma temos A2 x B1, A1 x B1 e B1 x B2 (Tabela 2 e Figura 5).

Tabela 1 - Médias e desvios padrões da proporção relativa dos hidrocarbonetos cuticulares de quatro colônias (A1, A2, B1 e B2) de *A. s. rubropilosa* em ambas as fases (FI, fase-I; FII, fase-II).

Compostos	A1		A2		B1		B2	
	FI	FII	FI	FII	FI	FII	FI	FII
Z-C <sub>19</sub>	-	-	-	-	1,04 ± 1,83	-	-	-
Z-C <sub>23</sub>	-	-	-	-	0,69 ± 1,24	-	-	-
<i>n</i> -C <sub>25</sub>	5 ± 1,64	6,32 ± 2,40	4,28 ± 1,65	5,97 ± 1,39	7,93 ± 2,28	6,25 ± 2,14	7,47 ± 2,28	6,32 ± 1,21
<i>n</i> -C <sub>26</sub>	-	0,54 ± 0,36	-	-	0,59 ± 0,44	-	0,78 ± 0,34	-
<i>n</i> -C <sub>27</sub>	10,5 ± 2,85	9,49 ± 2,48	10,33 ± 3,02	9,36 ± 2,20	17,0 ± 7,78	14,46 ± 2,57	10,92 ± 2,35	8,49 ± 1,93
<i>n</i> -C <sub>29</sub>	1,8 ± 0,68	0,62 ± 0,59	1,84 ± 0,88	1,23 ± 0,63	4,47 ± 3,77	4,14 ± 2,04	1,69 ± 0,7	0,92 ± 0,27
<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>30</sub>	-	-	-	-	0,61 ± 0,56	-	-	-
3,7,11-trimeC <sub>30</sub>	4,72 ± 1,17	-	2,87 ± 1,28	-	7,71 ± 2,46	-	3,72 ± 1,55	-
Z-C <sub>31</sub>	1,03 ± 0,23	4,65 ± 1,52	0,58 ± 0,36	4,17 ± 1,57	-	4,41 ± 0,96	-	3,92 ± 1,14
9-meC <sub>31</sub>	0,76 ± 0,35	-	-	0,69 ± 0,41	0,85 ± 0,72	-	0,6 ± 0,55	-
3,5-dimeC <sub>31</sub>	3,8 ± 1,41	3,22 ± 1,07	2,26 ± 1,09	2,8 ± 1,05	4,87 ± 1,86	2,48 ± 0,88	3,13 ± 1,5	3,37 ± 0,96
Não identificado (C <sub>32</sub> )	8,36 ± 1,8	3,88 ± 0,67	5,67 ± 1,79	5,84 ± 1,74	8,65 ± 3,53	3,6 ± 0,78	4,92 ± 2,04	5,39 ± 1,57
3,7,11-trimeC <sub>32</sub>	13,5 ± 3,03	8,08 ± 1,71	10,15 ± 3,26	8,28 ± 2,74	14,30 ± 4,76	6,97 ± 1,41	6,94 ± 2,5	8,12 ± 1,85
<i>n</i> -C <sub>33</sub>	1,08 ± 0,26	-	0,56 ± 0,39	-	-	-	-	-
4,8,12-TriMeC <sub>33</sub>	7,07 ± 1,44	3 ± 0,55	4,82 ± 1,56	4,02 ± 1,28	5,64 ± 2,87	2,55 ± 0,62	4,58 ± 1,91	5,08 ± 1,39
<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>33</sub>	6,12 ± 1,35	3,14 ± 0,75	4,08 ± 1,43	3,03 ± 1,12	4,84 ± 2,38	2,52 ± 0,61	3,43 ± 1,33	4,14 ± 1,29
Não identificado (C <sub>33</sub> )	-	6,07 ± 3,82	-	7,99 ± 4,84	-	2,62 ± 1,75	-	4,55 ± 3,31
Não identificado (C <sub>33</sub> )	1,08 ± 0,29	-	-	0,73 ± 0,30	0,54 ± 0,52	-	-	0,61 ± 0,36
<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>34</sub>	1,53 ± 0,57	0,58 ± 0,26	0,88 ± 0,61	1,1 ± 0,61	0,87 ± 0,66	-	0,84 ± 0,48	0,97 ± 0,25
3,7,11-trimeC <sub>34</sub>	5,54 ± 1,12	2,77 ± 0,57	3,68 ± 1,58	2,78 ± 1,36	4,11 ± 1,99	2,13 ± 0,47	2,78 ± 1,23	3,38 ± 1,01
Não identificado (C <sub>35</sub> )	1,36 ± 1,38	-	1,34 ± 1,27	-	-	-	-	-
4,8,12-trimeC <sub>35</sub>	0,95 ± 0,33	-	-	-	-	-	0,71 ± 0,44	0,69 ± 0,49
<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>35</sub>	3,49 ± 2,2	5,64 ± 1,94	6,94 ± 3,21	4,31 ± 1,74	2,99 ± 2,15	7,01 ± 1,07	6,79 ± 2,89	4,44 ± 1,12
Não identificado (C <sub>36</sub> )	0,5 ± 0,37	-	-	-	-	-	-	-
<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>37</sub>	13,54 ± 5,35	19,26 ± 3,98	24,33 ± 6,50	16,39 ± 4,69	8,97 ± 5,36	22,83 ± 3,28	23,7 ± 7,95	19,94 ± 3,10
<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>39</sub>	7,87 ± 3,24	22,03 ± 3,39	14,88 ± 4,41	20,34 ± 4,42	3,33 ± 2,34	18,04 ± 2,89	15,6 ± 6,27	19,63 ± 3,28
<i>a,b,c</i> -TriMeC <sub>40</sub>	-	-	0,51 ± 0,63	-	-	-	1,4 ± 1,66	-

Tabela 2 - Distância euclidiana dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares entre/dentro das colônias (A1, A1, B1 e B2). Abreviações: FI e FII, Fase I e Fase II.

	<b>FI A1</b>	<b>FI A2</b>	<b>FI B1</b>	<b>FI B2</b>	<b>FII A1</b>	<b>FII A2</b>	<b>FII B1</b>	<b>FII B2</b>
<b>FI A1</b>	2,95							
<b>FI A2</b>	3,85	2,8						
<b>FI B1</b>	4,48	5,25	3,97					
<b>FI B2</b>	4,28	3,49	5,21	3,14				
<b>FII A1</b>					2,58			
<b>FII A2</b>					2,94	2,61		
<b>FII B1</b>					2,99	3,37	1,83	
<b>FII B2</b>					2,69	2,79	3,05	2,16

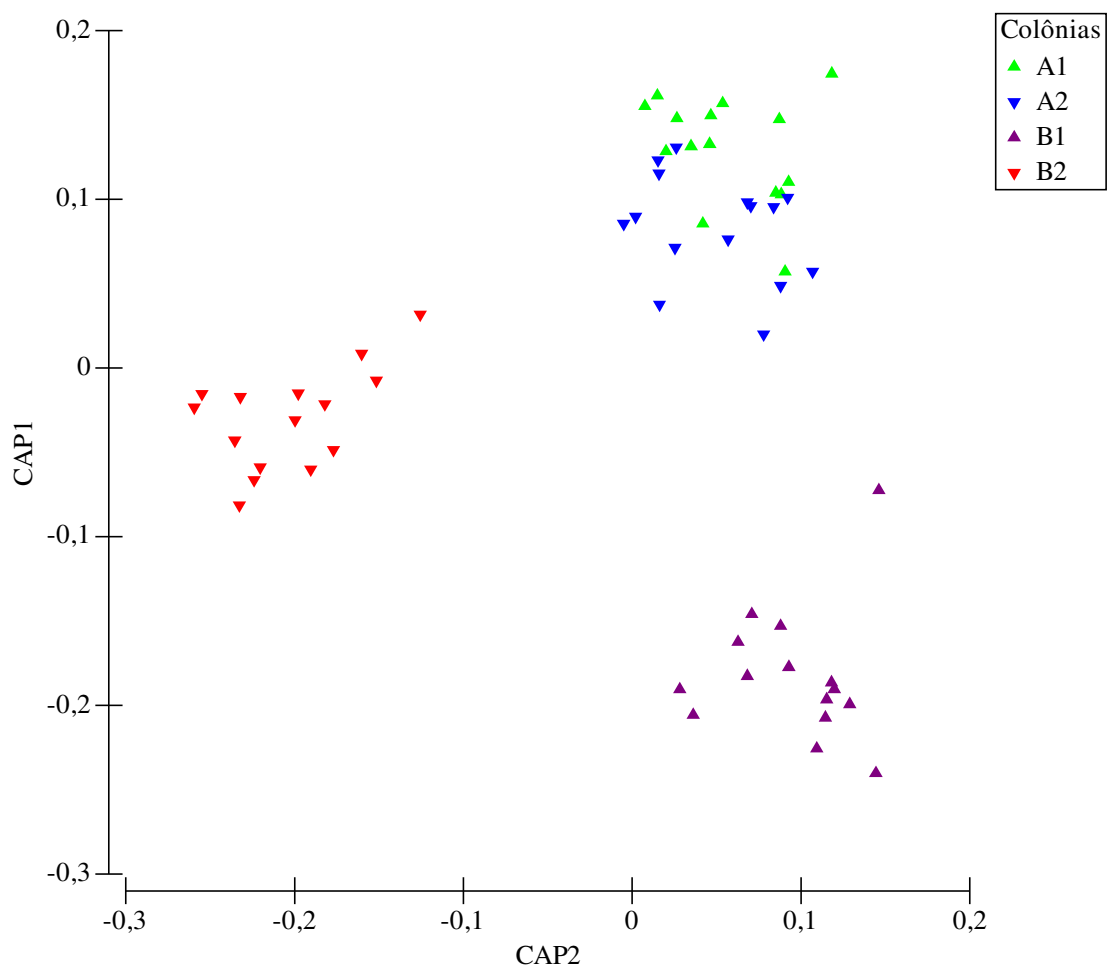


Figura 4 - Resultado da análise canônica das coordenadas principais realizado com os hidrocarbonetos cuticulares das colônias de *Atta sexdens*, fase-I.

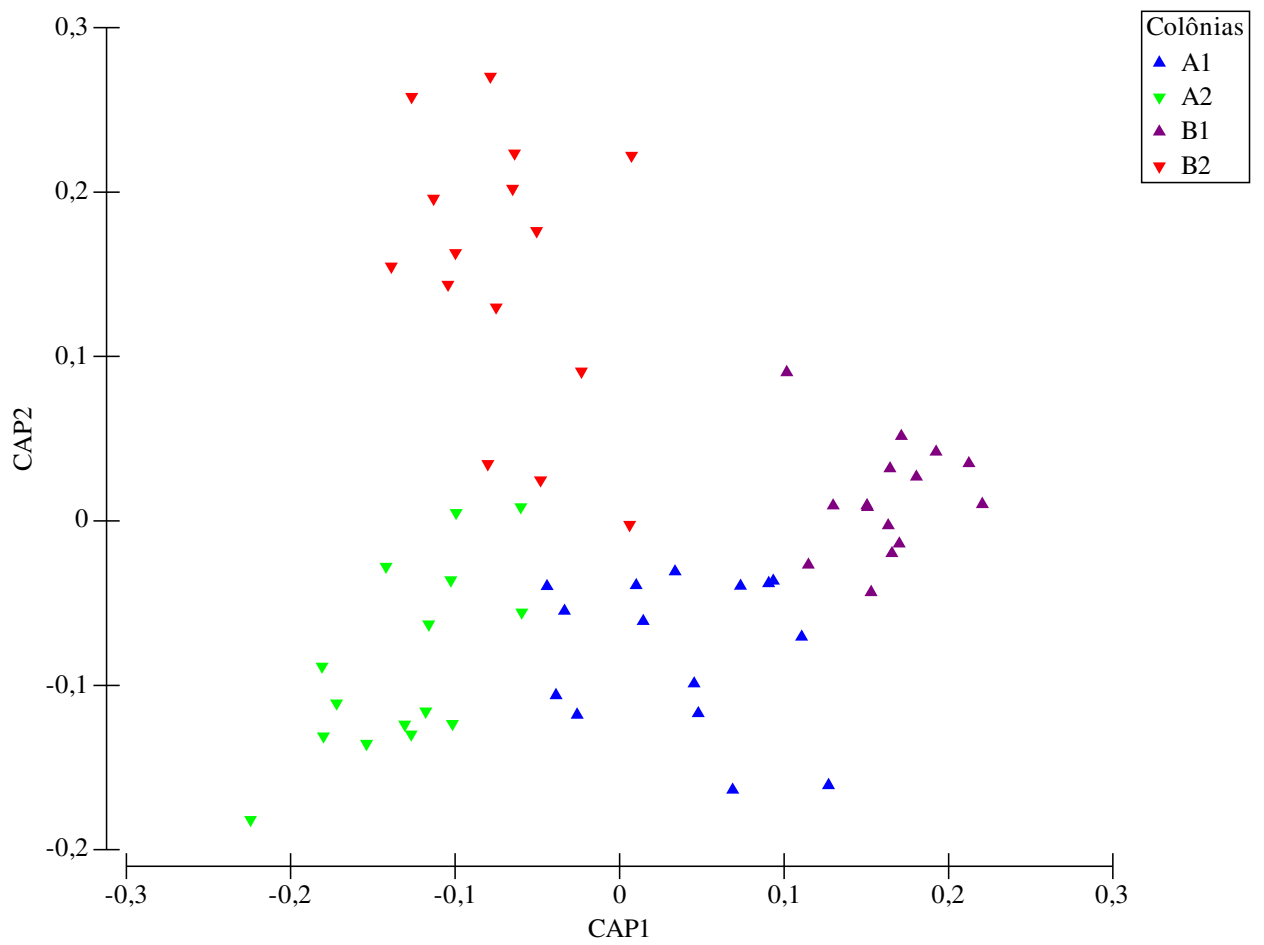


Figura 5 - Resultado da análise canônica das coordenadas principais realizado com os hidrocarbonetos cuticulares das colônias de *Atta sexdens*, fase-II.

## DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, indivíduos de colônias que compartilham um substrato foliar demonstram respostas comportamentais menos agressivas em relação àqueles indivíduos introduzidos. Além disso, desenvolveram uma composição química cuticular mais semelhante em comparação àquelas que tiveram acesso a um substrato diferente. Isso pode explicar o porquê no campo, as colônias de formigas cortadeiras são mais agressivas com as coespecíficas de colônias distantes (Jutsum, 1979) e possivelmente forrageiam em plantas de espécies diferentes. Na literatura já existem trabalhos que mostram a influência da dieta no perfil de CHCs em insetos, como por exemplo, na mariposa *Cydia pomonella* (Piskorski *et al.* 2010), percevejos do gênero *Macrolophus* (Gemeno *et al.* 2012) e em cupins (Liebig *et al.* 2009; Florane *et al.* 2004), mas principalmente investigado em formigas (Liang & Silverman 2000; Silverman & Liang 2001; Richard *et al.* 2004; Richard *et al.* 2004; Buczkowski *et al.* 2005; Ichinose *et al.* 2009).

Mas especificamente para as formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*, sabe-se que a dieta possui grande impacto no perfil de CHCs e conseqüentemente nas interações de reconhecimento entre companheiras de ninho (Richard *et al.* 2004; Lambardi *et al.* 2004), interessantemente, o efeito da dieta na composição da assinatura química colonial parece ser mais importante do que os odores derivados das rainhas (Richard *et al.* 2004). Esses dados, juntamente com os obtidos nesse estudo, reforçam a importância dos hidrocarbonetos de cutícula e contradizem aqueles obtidos por Hernández *et al.* (2006), que aponta o feromônio de alarme como compostos químicos mediadores do reconhecimento em *Atta*.

Entretanto, já há uma antiga discussão sobre o papel dos feromônios de alarme no sistema de reconhecimento em formigas e sabe-se, porém, que eles estão intimamente ligados a tal sistema – não como mediadores, mas sim como resposta. O feromônio de alarme é liberado após a detecção de um indivíduo estranho à colônia, ou seja, o processo de reconhecimento antecede a

liberação. Ademais, para que esses compostos pudessem ser utilizados como pistas químicas de reconhecimento eles necessitariam estar impregnados na cutícula das formigas em uma concentração abaixo do limiar de resposta de alarme que em geral eles causam (Vander Meer & Morel, 1998).

Esse estudo não relacionou a dieta com a composição química do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*, entretanto análises preliminares mostram que em relação aos compostos apolares extraídos em hexano, o fungo possui os mesmos hidrocarbonetos encontrados na cutícula das operárias recém-emergidas e que ambos não possuem os trimetialcanos encontrados nas operárias mais velhas. A esclerotização da cutícula é um processo importante para a deposição de hidrocarbonetos cuticulares, sendo que os recém-emergidos normalmente possuem uma menor diversidade e diferença de concentração de compostos quando comparadas as operárias mais velhas (Thompson, 1978; Thompson & Hepburn, 1978).

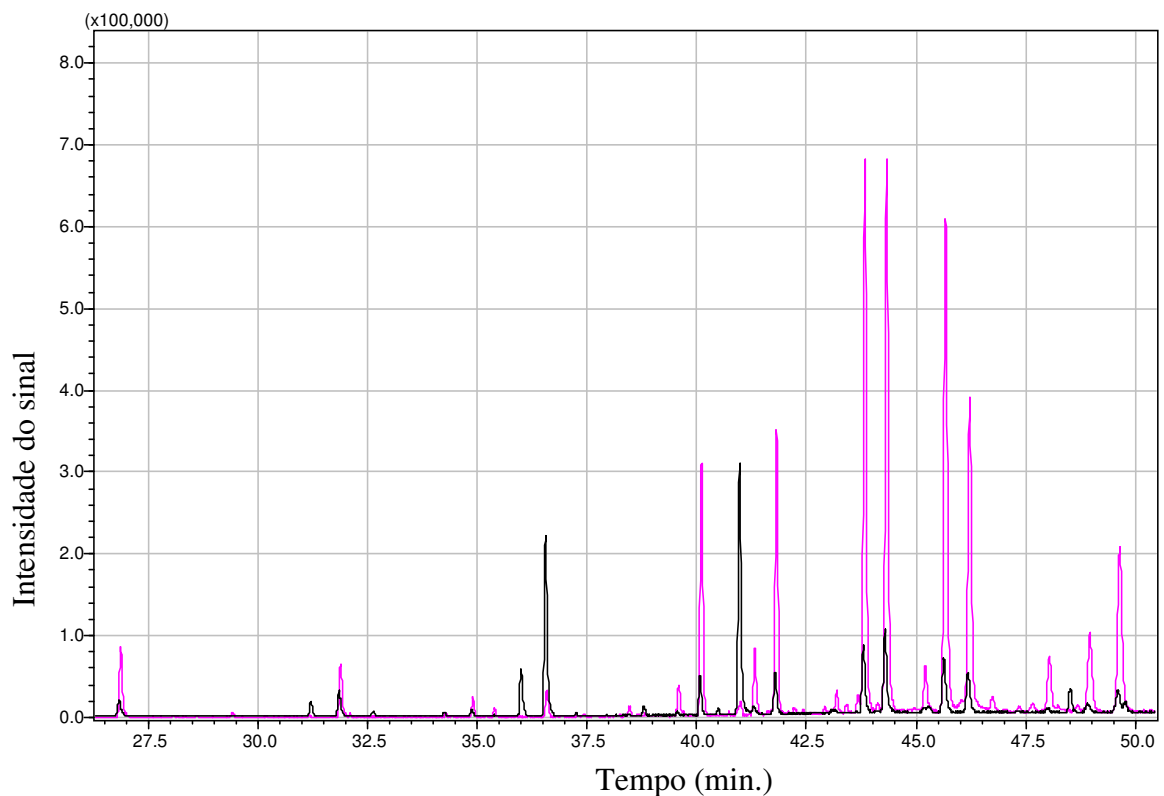


Figura 5 - Sobreposição entre o cromatograma do fungo *Leucoagaricos gongylophorus* (rosa) e o de uma operária recém-emergida de *A. sexdens*.

Durante o processo de reconhecimento, a antenação foi a primeira interação a ocorrer, entretanto, percebemos que essa interação não foi necessária para que as formigas residentes percebessem a presença das coespecíficas. Isso ficou evidente, pois em varias ocasiões, as formigas exibiram mandíbulas abertas na presença da introduzida quando ambas estavam distantes a aproximadamente 1 centímetro.

Os resultados obtidos nesse estudo mostram uma diferença significativa entre as fases em relação à frequência de atos comportamentais (mandíbula aberta, mordida e briga) em contraste com a não significância de uma (apreensão). Ao acompanhar a sequência das interações agonísticas isso é facilmente compreensível – ao notarem a presença da coespecífica na área de forragem, as formigas residentes adotavam uma postura de alarme com as mandíbulas abertas e então atacavam a introduzida com uma sequência de mordidas que em vários casos resultaram em



brigas, principalmente entre as combinações envolvendo as colônias A1 vs. B1. Como na fase-II do experimento houve uma redução da resposta agressiva, conseqüentemente a análise estatística aponta a diferença entre elas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blomquist, G. J. 2010. Structure and analysis of insect hydrocarbons. In Blomquist, G. J.; Bagnères, A. G. (Eds). *Insect Hydrocarbons*. Cambridge University Press, Cambridge. 19-34 pp.
- Blomquist, G. J.; Bagnères, A. G. 2010. Introduction: history and overview of insect hydrocarbons. In Blomquist, G. J.; Bagnères, A. G. (Eds). *Insect Hydrocarbons*., Cambridge University Press, Cambridge. 3-18 pp.
- Buczkowski, G.; Kumar, R.; Suib, S. L.; SILVERMAN, J. 2005. Diet-related modifications of hydrocarbon profiles of the argentine ant, *Linepithema humile*, diminishes aggression intercolony aggression. *J Chem Ecol*, **31**(4): 829-843.
- Cherrett, J. M. 1980. Possible reasons for the mutualism between leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) and their fungus. *Biol. Ecol. Mediter*, **7**: 113-122.
- Della- Lucia, T. M. C. (Ed.) 1993. As Formigas Cortadeiras. Editora Folha de Viçosa, Viçosa. 262 pp.
- Florane, C. B.; Bland J M.; Husseneder, C.; Raina, A. K. 2004. Diet-mediated inter-colonial aggression in the Formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus*. *J Chem Ecol*, **30**: 2259-2574.
- Gemeno, C.; Laserna, N.; Riba, M.; Valls, J.; Castane, C.; Alomar, O. 2012. Cuticular hydrocarbons discriminate cryptic *Macrolophus* species (Hemiptera: Miridae). *Bulletin of Entomological Research*, **102**(6): 624-631.
- Hernández, J.; Goitia., V. W.; Osio, A.; Cabrera ,H.L.; Sainz, C.; Jaffe, K. 2006. Leaf-cutter ant species (Hymenoptera: *Atta*) differ in types of cues used to differentiate between self and others. *Animal Behaviour*, **71**: 945-952 pp.
- Howard, R. W. & Blomquist, G. J. 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.*, **50**: 371–392.

- Ichinose, K.; Boulay, R.; Cerdá, X. ; Lenoir, A. 2009. Influence of queen and diet on nestmate recognition and cuticular hydrocarbon differentiation in a fission-dispersing ant, *Aphaenogaster senilis*. *Zoolog. Sci.*, **26**(10): 681-685.
- Jutsum, A. R. 1979. Interspecific aggression in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Animal Behavior*, **27**: 833-838.
- Lambardi, D.; Chegia, B.; Turilazzi, S.; Boomsma, J. J. 2004. Diet-induced aggression among colonies of the leafcutter ant *Acromyrmex echinatio* Forel (Hymenoptera Formicidae). *REDIA, LXXXVII*, **21**: 9-221.
- Liebig, J.; Eliyahu, D.; Brent, C. S. 2009. Cuticular hydrocarbons profiles indicate reproductive status in the termite *Zootermopsis nevadensis*. *Behav Ecol Sociobiol*, **63**: 1799-1807.
- Marinho, G. C. S.; Della-Lucia, M. T. C.; Ribeiro, M. M. R.; Magalhães, S. T. V.; Guedes, R. N. C. & Jham, G. N. 2008. Interference of b-Eudesmol in nestmate recognition in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Bulletin of Entomological Research*, **98**: 467-473.
- Martin, M.M.; MacConnel, J. G. 1970. The alkanes of *Atta colombica*. *Tetrahedron*. **26**: 307-319.
- Martin, S. J.; Vitikainen, E.; Helanterä, H.; Drijfhout, F. P. 2008. Chemical basis of nest-mate discrimination in the ant *Formica exsecta*. *Proc. R. Soc.*, **275**: 1271-1278.
- Nielsen, J.; Boomsma, J. J.; Oldham, N. J.; Petersen, H. C; Morgan, E. D. 1999. Colony-level and season-specific variation in cuticular hydrocarbon profiles of individual workers in the ant *Formica truncorum*. *Insectes Sociaux* , **46**: 58–65.
- Pirkoski, R.; Trematerra, T.; Dorn, S. 2010. Cuticular hydrocarbon profiles of codling moth larvae, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), reflect those of their host plant species. *Biological Journal of the Linnean Society*, **101**(2): 376-384.

- Richard, F. J.; Heftz, A.; Christides, J. P. ; Errard, C. 2004. Food influence on colonial recognition and chemical signature between nestmates in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *J Chem Ecol*, **14**(1): 9-16.
- Richard, F. J.; Hunt, J. H.; Intracolony chemical communication in social insects. 2010. *Insect. Soc.* **60**: 275-291.
- Silva, A.; Bacci Jr., M.; Siqueira, C. G.; Bueno, F. C.; Pagnocca, F.C.; Hebling, M. J. A. 2003. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology*, **49**: 307-313.
- Silverman, J.; Liang, D. 2001. Colony disassociation following diet partitioning in a unicolonial ant. *Naturwissenschaften*, **88**: 73-77.
- Siqueira, C. G.; Bacci Jr., M.; Pagnocca, F. C.; Bueno, O. C.; Hebling, M. J. A. 1998. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Applied environmental Microbiology*, **64**: 4820-4822.
- Thompson, P. R. 1978. Histological development of cuticle in the worker honeybee, *Apis mellifera adansonii*. *Journal of Apicultural Research*, **17**: 32-40.
- Thompson, P. R.; Hepburn, H. R. 1978. Changes in chemical and mechanical properties of honeybee (*Apis mellifera adansonii*). *Journal of Comparative Physiology*, **126**: 257-262.
- Vander Meer, R. K.; Morel, L. 1998. Nestmate recognition in ants. In: Vander Meer, R. K.; Breed, M.; Wintson, M.; Espelie, K. E. (Eds). *Pheromone Communication in Social Insects*. Westview Press, 79-103 pp.
- Vilela, E. F. 1986. Status of leaf-cutting ant control in Forest plantations in Brazil. In: Lofgren, C.S.; Vander Meer, R.K. (eds.). *Fire ants and leaf-cuttings ants: biology and management*. Boulder: Westview Press, 399-408 pp.

- Vilela, E. F. 1994. Feromônios no controle das formigas cortadeiras. In: *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, **23**: 271-274 pp.
- Vilela, E. F.; Della-Lucia, M. T. C. 1992. Comunicação Química. In Della-Lucia, T. M. C. (Ed). *As Formigas Cortadeiras*. Folha de Viçosa, Viçosa. 262 pp.
- Wilson, E. O. 1968. The ergonomics of caste in the social insects. *American Naturalist*, **102**: 41-66 pp.
- Wilson, E. O. 1971. *The Insect Societies*. Belknap Press of Harvard Univ. Press, Cambridge, MA. 548 pp.
- Wilson, E. O. 1980. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: *Atta*). I: The overall pattern in *A. sexdens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **7**: 143-156 pp.

## *Considerações finais*

Através dos resultados obtidos podemos concluir que as operárias de *Atta sexdens* apresentam variações no perfil de hidrocarbonetos cuticulares em relação as quatro subcastas morfológicas (capítulo 1), fazendo com que essas possuam assinaturas químicas cuticulares. Em relação ao substrato foliar (capítulo 2), concluimos que esse recurso constitui um dos fatores ambientais influentes sobre o perfil de hidrocarbonetos cuticulares, o que conseqüentemente altera as interações de reconhecimento interespecífico, minimizando ou maximizando a resposta agressiva entre colônias que compartilham ou não o mesmo recurso.

Estudos que envolvam o papel desses compostos como pistas de decisão de tarefas entre as operárias, bem como a atuação de determinadas classes de hidrocarbonetos no reconhecimento interespecífico são necessários para que possamos compreender melhor como esses compostos estão envolvidos na organização social e no sucesso evolutivo dessas formigas.