

unesp



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
(CIÊNCIAS BIOLÓGICAS)**

**A GLÂNDULA SALIVAR CEFÁLICA E OS COMPOSTOS DA SECREÇÃO E DE
SUPERFÍCIE CUTICULAR EM ALGUMAS ESPÉCIES DE ABELHAS
EUSSOCIAIS (HYMENOPTERA, APINAE)**

SILVANA BEANI POIANI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular .

Mai - 2012

SILVANA BEANI POIANI

**A glândula salivar cefálica e os compostos da secreção e de
superfície cuticular em algumas espécies de abelhas eussociais
(Hymenoptera, Apinae).**

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Câmpus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor
em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Carminda da Cruz Landim

Rio Claro
2012

595.799 Poiani, Silvana Beani
P749g A glândula salivar cefálica e os compostos da secreção e de superfície cuticular em algumas espécies de abelhas eussociais (Hymenoptera, Apinae) / Silvana Beani Poiani. - Rio Claro : [s.n.], 2012
131 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carminda da Cruz Landim

1. Abelha. 2. Estudos ultraestruturais e químicos 3.
Cutícula de abelhas. I. Título.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: A glândula salivar cefálica e os compostos da secreção e de superfície cuticular em algumas espécies de abelhas eussociais (Hymenoptera, Apinae)

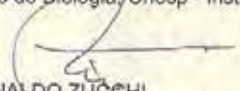
AUTORA: SILVANA BEANI POIANI

ORIENTADORA: Profa. Dra. CARMINDA DA CRUZ LANDIM

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. CARMINDA DA CRUZ LANDIM

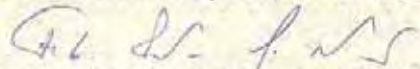
Departamento de Biologia, Unesp - Instituto de Biociências de Rio Claro/SP


Prof. Dr. RONALDO ZUCCHI

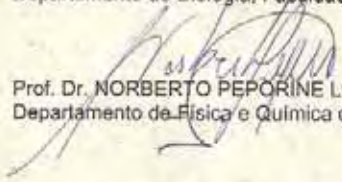
Depto. de Biologia / Universidade de São Paulo


Prof. Dr. JOSÉ EDUARDO SERRÃO

Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa/MG


Prof. Dr. FABIO SANTOS DO NASCIMENTO

Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, Ribeirão Preto/SP


Prof. Dr. NORBERTO PEPORINE LOPES

Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, Ribeirão Preto

Data da realização: 15 de maio de 2012.

À minha família, por ser meu porto seguro, dedico.

Agradecimentos

Concluo esta etapa de minha formação acadêmica fazendo alguns agradecimentos:

Agradeço,

- ✚ Ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - Unesp, Campus de Rio Claro e Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular por me acolher e pela oportunidade;
- ✚ A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro;
- ✚ A minha orientadora Carminda da Cruz Landim por todos os ensinamentos durante a graduação e pós-graduação, pela paciência, pela disponibilidade em sempre ajudar mesmo tendo sido uma orientação à distância e, conseqüentemente, por acreditar na minha capacidade de condução da pesquisa e por me apoiar sempre;
- ✚ Ao Prof. Dr. Ronaldo Zucchi por disponibilizar o uso do cromatógrafo gasoso na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto e à técnica de laboratório Izabel C. Turatti e aluna Maria Juliana Ferreira Caliman pelas ajudas com as análises cromatográficas;
- ✚ A Keele University, Prof. Dr. E.D. Morgan e Dr. F.P. Drijfhout pela oportunidade de estágio e desenvolvimento de parte da pesquisa, pelo do apoio e ensinamentos químicos;
- ✚ Ao Prof. Dr. Paulo M. B. Landim pelas aulas de estatísticas multivariadas e dicas;
- ✚ Em especial ao Túlio M. Nunes pela paciência, muitos ensinamentos e trocas de ideia;
- ✚ Ao Bruno Berger e Thaísa C. Roat pelo indispensável suporte para realização da pesquisa principalmente quando eu estava no Reino Unido;
- ✚ A minha família: Osvaldo, Adelia, Claudia, Fernando, Marcia e Devis por estarem sempre presentes, me ajudando de todas as formas possíveis e apoiando minhas decisões;
- ✚ A minha irmã-amiga Magdalena Rzewuska por quem tenho imenso carinho e admiração, por toda ajuda e pela amizade sincera que se formou entre nós;
- ✚ Aos colegas de departamento, principalmente Alex, Luís e Pablo pelas conversas produtivas e momentos de distração também;
- ✚ Aos colegas de turma da graduação que continuam em Rio Claro;

- ✚ Aos amigos Fernanda Zambonini, Mirella, Tati, Fernanda Ribeiro, Alex (gaúcho) e Tiago Botari pela amizade e apoio e em especial ao meu físico Vinícius Santana por toda paciência, atenção, carinho e incentivo;
- ✚ Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) por disponibilizar o uso do cromatógrafo gasoso e ao técnico Sebastião pelas ajudas com as análises químicas.
- ✚ Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

RESUMO: As espécies de abelhas eussociais usam várias estratégias para a comunicação entre os membros da sociedade com a finalidade de coordenar as diferentes tarefas das quais esta sociedade depende. A comunicação através de sinais químicos é uma das mais difundidas e tem papel primordial na manutenção das colônias. As fontes dos compostos químicos usados na comunicação podem ser várias, mas boa parte dos compostos tem origem em glândulas exócrinas distribuídas pelo corpo das abelhas. O presente estudo abrange a análise da composição das glândulas salivares cefálicas (GSC) e da superfície cuticular através de cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas e de testes citoquímicos para detecção de compostos lipídicos e de atividade de fosfatases ácidas nas glândulas de operárias abelhas eussociais das espécies *Apis mellifera*, *Scaptotrigona postica* e *Melipona quadrifasciata* enquanto recém emergidas, trabalhando na área de cria e como forrageiras. As diferenças qualitativas e quantitativas obtidas na análise cromatográfica foram submetidas a análises estatísticas. O objetivo do estudo foi o de testar hipóteses de que há correlação entre a fisiologia das células glandulares e das substâncias presentes na secreção e na superfície cuticular, a fim de verificar: 1. Mudanças na composição celular relacionáveis à função secretora; 2. Relação entre a fase da vida/função das operárias e a composição da secreção glandular e dos compostos cuticulares, ou seja, que a composição da secreção pode funcionar na colônia como sinais, tanto de reconhecimento como de capacitação para determinada tarefa; 3. Se existe a possibilidade da contribuição da glândula para a formação do perfil químico cuticular nestas espécies de abelhas. Estudos prévios da morfologia das células glandulares mostraram a natureza lipídica da secreção das GSC, portanto, a análise citoquímica das células glandulares visou a presença destes compostos com a finalidade de acompanhar a dinâmica de sua produção, armazenamento, origem e descarga, enquanto a pesquisa da atividade da fosfatase ácida destinou-se a acompanhar o ciclo de desenvolvimento celular. Foram verificadas diferenças entre *A. mellifera* e *S. postica* quanto ao ciclo celular e à origem do produto glandular, que na primeira espécie pode conter material de excreção. As análises cromatográficas mostraram que para as espécies *A. mellifera* e *M. quadrifasciata*, os principais compostos glandulares, são hidrocarbonetos e correspondem aos principais compostos de superfície cuticular. Deste modo, para estas duas espécies, a hipótese de participação da glândula na constituição do perfil cuticular foi confirmada. Já em *S. postica*, foi constatado que a secreção glandular contém compostos oxigenados, dos quais os ésteres são os compostos mais abundantes na fase de forrageio. Devido a estudos anteriores, os quais verificaram a importância dos ésteres contidos na secreção das GSC de meliponíneos na comunicação da fonte de alimento

através de trilha de cheiro, sugere-se a possibilidade dos ésteres encontrados nas secreções glandulares das forrageiras de *S. postica* estarem relacionados com esta mesma função. O perfil químico da superfície cuticular das operárias de *S. postica*, assim como nas outras duas espécies aqui estudadas, é formado por hidrocarbonetos, ou seja, nesta espécie não há relação entre os compostos produzidos nas glândulas e os compostos de superfície, superfície, mas sua composição permite separar as operárias em classes funcionais. O mesmo se verifica com as mudanças de composição da secreção glandular. Em conclusão, tanto as análises químicas das secreções glandulares como as de superfície cuticular, nas três espécies, apontaram que há diferenças químicas estatisticamente significantes de acordo com a fase da vida/função exercida pela operária na colônia. Dos 03 grupos de operárias estudados (recém emergidas-RE, trabalhando na área de cria-AC e forrageiras-FO), em particular as operárias AC de *S. postica*, apresentaram divisão em subgrupos levando-se em conta os compostos encontrados na secreção glandular, indicando que os diversos compostos responsáveis pela divisão em subgrupos podem estar relacionados às variadas tarefas desempenhas nesta fase da operária.

Palavras-chave: citoquímica. cromatografia em fase gasosa. feromônio. éster. hidrocarbonetos. sistema salivar

ABSTRACT: Eusocial bees use several strategies for communication among the members of the society with the purpose of coordinating the different tasks necessary to colony maintenance. The communication by chemical cues is one of the most frequent. There are several sources for the chemicals used in the communication, but most of them are produced by exocrine glands distributed over all body of the bees. The present study includes analysis of the secretion compounds from cephalic salivary glands (CSG) and from cuticular surface by gas chromatography-mass spectrometry and citochemical tests for lipid detection and acid phosphatase activities in CSG of workers' of *Apis mellifera*, *Scaptotrigona postica* and *Melipona quadrifasciata* in different phases of life: newly emerged, working in brood area and foragers. The qualitative and quantitative differences obtained in the chemical analysis were submitted to statistical analyses. The objective of the study was to correlate the glandular cells physiology comparing the substances in their cytoplasm and those found in glandular secretion and on cuticular surface in order to test some hypothesis and verify: 1. Changes in the cellular compounds related to the secretory function; 2. The relationship between the phase/task of the workers' and the compounds in glandular secretion and on cuticular surface; 3. If exist the possibility of gland contribution to forming the cuticular chemical profile in these species of bees. Previous morphological studies of glandular cells showed the lipid nature of the CSG secretion, therefore, glandular citochemical analysis aimed to show the presence of these compounds with the purpose of accompanying their production dynamics, storage, origin and discharge, while the research of acid phosphatase activity aimed to accompany the cellular development cycle. Differences were verified between *A. mellifera* and *S. postica* for the presentation of the cellular components suggesting that in *A. mellifera* the gland might have a excretory function besides secretion. The chromatographic analyses showed that hydrocarbons are the main compounds on glands secretion in workers of *A. mellifera* and *M. quadrifasciata* and these compounds correspond to the main ones found on cuticular surface surface corroborating the hypothesis of gland secretion contribution for the cuticular composition. This way, we suggest the gland participation in cuticular chemical profile in these two species. However, it was verified that the glandular secretion in *S. postica* contains oxygenated compounds, and sters are the most abundant compounds in forager workers. Due previous studies, which verified the importance of the sters contained in the CSG secretion of meliponineos in the communication of the food source by scent trail, we suggest the possibility of sters found in the glandular secretions of foragers of *S. postica* be related with this same function. The chemical profile of the workers' of *S. postica* cuticular surface, as well as in the other two

species here studied, it is formed by hydrocarbons, in other words, in this species there is no relationship between the compounds produced in the glands and those ones on surface. However, chemical analyses of glandular secretions and cuticular surface of *S. postica* showed that there are differences chemical statistically significant among phase/task of the worker in the colony corroborating the hypothesis made. In relation to 03 groups of workers studied in *S. postica*, those ones that are working in brood area presented division in subgroups taken into account the compounds found in the glandular secretion, indicating that the several compounds responsible for the division in subgroups can be related to the varied tasks carry out in this phase of the worker.

Keywords: citochemistry. gas chromatography. hydrocarbons. pheromone. salivary system.
ster

Sumário

	Página
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. METODOLOGIA GERAL	18
4. RESULTADOS	19
4.1. DETECÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE FOSFATASE ÁCIDA E LIPÍDIOS EM GLÂNDULAS SALIVARES CEFÁLICAS DE FÊMEAS E MACHOS DE <i>APIS MELLIFERA</i> E <i>SCAPTOTRIGONA POSTICA</i> (HYMENOPTERA, APIDAE)	20
1. Introdução.....	22
2. Material e métodos.....	24
2.1. Material	24
2.2. Métodos	24
2.2.1. Localização de lipídios pelo método do Ósmio Imidazol (OI) (ANGERMÜLLER & FAHIMI, 1982)	24
2.2.2. Localização de fosfatases ácidas (FA) (RYDER & BOWEN, 1975)	25
3. Resultados	25
3.1. Localização de lipídios (OI)	25
3.1.1. <i>Apis mellifera</i>	25
3.1.2. <i>Scaptotrigona postica</i>	29
3.2. Localização de fosfatases ácidas (FA)	31
4. Discussão	33
5. Referências bibliográficas	35
4.2. SERIAM AS GLÂNDULAS SALIVARES CEFÁLICAS DE OPERÁRIAS DE <i>APIS MELLIFERA</i> E <i>MELIPONA QUADRIFASCIATA</i> (HYMENOPTERA, APIDAE) FONTES DE HIDROCARBONETOS CUTICULARES?	39
1. Introdução.....	41
2. Material e métodos.....	43
2.1. Material	43
2.1.1. <i>Apis mellifera</i>	43
2.1.2. <i>Melipona quadrifasciata</i>	43
2.2. Métodos	44

2.2.1. <i>Apis mellifera</i>	44
2.2.2. <i>Melipona quadrifasciata</i>	44
3. Resultados	45
3.1. <i>Apis mellifera</i>	45
3.1.1. Perfil químico da secreção das glândulas salivares cefálicas	45
3.1.2. Perfil químico da superfície cuticular	46
3.1.3. Correlação entre os compostos glandulares e de superfície	47
3.2. <i>Melipona quadrifasciata</i>	56
3.2.1. Perfil químico da secreção das glândulas salivares cefálicas	56
3.2.2. Perfil químico da superfície cuticular.....	56
3.2.3. Correlação entre os compostos glandulares e de superfície	57
4. Discussão	66
5. Referências bibliográficas	71
4.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AS POSSÍVEIS FUNÇÕES DA SECREÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES CEFÁLICAS DE OPERÁRIAS DE <i>SCAPTOTRIGONA POSTICA</i> (HYMENOPTERA, APIDAE) EM DIFERENTES FASES DA VIDA.....	77
1. Introdução.....	79
2. Material e métodos.....	80
2.1. Material	80
2.2. Métodos	80
2.2.1. Análise do perfil químico da secreção glandular	80
2.2.2. Análises estatísticas.....	81
3. Resultados	82
4. Discussão	89
5. Referências bibliográficas	91
4.4. PERFIL QUÍMICO DA SUPERFÍCIE CUTICULAR DE OPERÁRIAS DE <i>SCAPTOTRIGONA POSTICA</i> LATREILLE, 1807 (HYMENOPTERA, APIDAE) DESEMPENHANDO DIFERENTES FUNÇÕES NA COLÔNIA	94
1. Introdução.....	96
2. Material e métodos.....	98
2.1. Material	98
2.2. Métodos	99
2.2.1. Análise do perfil químico da superfície cuticular	99
2.2.2. Identificação das posições das insaturações nos alcenos cuticulares	99
2.2.3. Análises estatísticas.....	100

3. Resultados	100
4. Discussão.....	114
5. Referências bibliográficas	117
5. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	122
6. CONCLUSÕES FINAIS.....	124
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126

A glândula salivar cefálica e os compostos da secreção e de superfície cuticular em algumas espécies de abelhas eussociais (Hymenoptera, Apinae).

1. INTRODUÇÃO

As abelhas representam uma das maiores radiações dentro dos Hymenoptera, com cerca de 30.000 espécies distribuídas pelo mundo e estima-se cerca de 5.000 espécies só no Brasil. A maior parte das espécies tem como fonte de energia o néctar ou óleo e, de proteína, o pólen (MICHENER, 1974). Ainda assim, existem 03 espécies comprovadamente carnívoras e algumas outras cleptobióticas que vivem às custas do roubo do néctar e pólen coletados por outras abelhas (ROUBIK, 1992).

Segundo Silveira et al. (2002) as abelhas estão classificadas e organizadas em 9 famílias: Andrenidae, Apidae, Colletidae, Dasypodidae, Halictidae, Megachilidae, Meganomiidae, Melittidae, Stenotritidae. Dentre as famílias citadas, a Apidae já foi utilizada para designar todas as abelhas, já que é a família mais diversificada e com ampla distribuição em todos os continentes (ROIG-ALSINA & MICHENER, 1993).

As espécies utilizadas no presente estudo, *Apis mellifera*, *Scaptotrigona postica* e *Melipona quadrifasciata*, pertencem à família Apidae, subfamília Apinae, tribo Apini, subtribos Apina (*A. mellifera*, entre outras espécies de *Apis*) e Meliponina (*S. postica* e *M. quadrifasciata*, entre outros meliponíneos) (SILVEIRA et al., 2002).

A subtribo Apina contém o gênero *Apis* e apresenta grande diversificação nas regiões tropicais da Ásia e África e era restrita ao Velho Mundo até que *Apis mellifera* fosse introduzida nos demais continentes para produção comercial de mel. No Brasil é representada por políbridos resultantes dos cruzamentos entre as abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier (1836), anteriormente classificadas como *Apis mellifera adansonii* Latreille (1804), e as raças européias *A. m. mellifera* Linnaeus (1758), *A. m. ligustica* Spinola (1806), *A. m. carnica* Pollmann (1879), *A. m. caucasica* Gorbachev (1916), que foram introduzidas na América antes da chegada das africanas em 1956, predominando, nestes políbridos, as características morfológicas e comportamentais das africanas. A subtribo Meliponina reúne as chamadas “abelhas sem ferrão” cujas fêmeas possuem o ferrão atrofiado e é representada por várias centenas de espécies em todas as regiões tropicais do mundo, bem como nas regiões subtropicais do hemisfério sul (SILVEIRA et al., 2002).

As diversas espécies de abelhas podem ter hábitos de vida desde solitários até o mais alto grau de sociabilidade. As abelhas que apresentam hábitos sociais mais avançados são chamadas de abelhas eussociais e pertencem às subtribos Apina, Meliponina e Bombina. As características que definem as abelhas eussociais são: a sobreposição de gerações, o cuidado com a prole e a divisão do trabalho reprodutivo entre as fêmeas.

A colônia das abelhas eussociais é formada pelos indivíduos adultos (machos, rainhas e operárias) e pela cria em várias fases de desenvolvimento. Os machos só estão presentes na colônia em determinadas épocas favoráveis para a reprodução. São os responsáveis pela fecundação da rainha e em Apina têm pouca ou nenhuma função social, mas em Meliponina há relatos de que eventualmente trabalhem com o cerume, desidratem néctar, incubem células de cria, defendam o ninho, sejam capazes de seguir pistas odoríferas e se alimentem nas flores, (KERR, 1951; IMPERATRIZ-FONSECA, 1973; NOGUEIRA-NETO, 1997).

As operárias e rainhas constituem castas femininas e exercem funções diferentes: as rainhas são as principais responsáveis pela postura de ovos fecundados ou não, enquanto as operárias realizam as demais tarefas de manutenção da colônia, tais como limpeza, construção, cuidados com a cria e com a rainha, guarda e coleta de alimento, e postura de ovos que podem eventualmente dar origem a machos. O trabalho realizado pelas operárias segue uma seqüência determinada pela idade ou maturidade fisiológica do indivíduo, a qual é denominada de polietismo etário ou polifenismo, estando, contudo, sujeita às necessidades da colônia (FREE, 1980).

Para a adequada convivência na colônia e adequado desenvolvimento das inter-relações sociais o reconhecimento dos membros que a co-habitam e de seus *status* é essencial (WILSON, 1971; BRIAN, 1983; HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). A origem das pistas usadas no reconhecimento dos membros da colônia foi primeiramente investigada por Fielde (1904) e posteriormente estudada em numerosas espécies (WILSON, 1971; HÖLLDOBLER & MICHENER, 1980; HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). As pistas de reconhecimento são olfatórias, como ocorre em muitos vertebrados e invertebrados (HEPPER, 1986) e podem ser produzidas pelo próprio indivíduo ou adquiridas.

Os insetos apresentam como constituinte da camada mais superficial da cutícula, a epicutícula, uma camada de cuja composição fazem parte ceras compostas por hidrocarbonetos. As ceras da epicutícula têm a função primária de evitar dessecação dos insetos terrestres por perda de água (LOCKEY, 1988). Essas substâncias são produzidas por enócitos e pelas próprias células epidérmicas durante a deposição da cutícula, por ocasião das mudas, repostas nos intervalos destas e durante a vida adulta. Além da função primária de

proteção contra a dessecação, as ceras ou hidrocarbonetos epicuticulares constituem uma espécie de “finger print” que serve para reconhecimento dos indivíduos (HOWARD & BLOMQUIST, 2005). Os sinais químicos presentes sobre a cutícula dos insetos constituem, então, o seu perfil hidrocarbônico particular.

Bioensaios têm mostrado que os hidrocarbonetos cuticulares são usados como sistema de reconhecimento tanto em insetos solitários como nos sociais. A função deste sistema de reconhecimento é capacitar o inseto a reconhecer e, possivelmente discriminar sua própria espécie, sexo ou membro da comunidade, do de outras categorias (SINGER, 1998).

Nas abelhas, aos hidrocarbonetos primários, estruturais, ou endógenos produzidos sob comando do genótipo, juntam-se hidrocarbonetos exógenos ou ambientais, que são adquiridos ao longo da vida por contato com o habitat, seja dentro da colônia no contato com a cera, seja fora da colônia nos locais de coleta durante as atividades de forrageio. Enquanto os primeiros podem diferenciar indivíduos e espécies, os outros diferenciam colônias ou indivíduos de determinadas colônias ou comunidades, mas ambos participam do sistema de reconhecimento.

Dentre as pistas de reconhecimento de origem ambiental (exógenos), destacam-se as que podem ser adquiridas a partir do alimento coletado (*Formica*: LANGE, 1960; *Solenopsis invicta*: OBIN & VANDER MEER, 1988) ou de material do ninho (*Bombus*: FREE, 1961; *Pogonomyrex badius*: HANGARTNER et al., 1970; *Solenopsis invicta*: HUBBARD, 1974; *Polistes*: GAMBOA, 1996). Estas pistas são adquiridas dentro da colônia, de modo que todos os seus membros apresentam o mesmo odor ou odores similares. A mistura/combinção de diferentes pistas é o que gera as diferenças entre as colônias, permitindo distinguir entre os membros de uma e de outras (DOWNS & RATNIEKS, 1999).

Estudos feitos com muitas espécies de insetos solitários e sociais têm mostrado que, no geral, o perfil de hidrocarbonetos tende a ser sexo e espécie-específico (HOWARD, 1993; SINGER, 1998) e nos insetos sociais também colônia e casta-específicos (SINGER, 1998), além de variar entre os diferentes estágios da vida do inseto (LOCKEY, 1991). Operárias de *A. mellifera* e *Scaptotrigona bipunctata* discriminam os membros de sua colônia dos de outra da mesma espécie devido, pelo menos parcialmente, aos hidrocarbonetos cuticulares (JUNGNICKEL et al., 2004; MORITZ & HILLESHEIM, 1990).

Em geral no inseto adulto as células epidérmicas, uma das possíveis produtoras dos hidrocarbonetos cuticulares, encontram-se inativas na maior parte da extensão do tegumento, restando aos enócitos e possivelmente a glândulas exócrinas com a mesma origem ectodérmica, a função de produzi-los ou de transferi-los para a epicutícula.

Dados apontam para a possibilidade dos hidrocarbonetos cuticulares, ou pelo menos parte deles, terem nos himenópteros, origem glandular ou embora não secretados pelas glândulas, serem por elas veiculados (excretados) para a cutícula (HEFETZ, 1987; HEFETZ et al., 1993; TERZO et al., 2005; BERTSCH et al., 2005; LAHAV et al., 1999; SOROKER & HEFETZ, 2000; SOROKER et al., 1994).

Em todos os insetos, um par de glândulas salivares está localizado no tórax e seus ductos penetram na cabeça onde se fundem e formam um único ducto excretor o qual se abre entre a base da língua e o premento do lábio. A função dessas glândulas é muito variada dependendo da dieta do inseto, de modo que é impossível atribuir-lhe nome funcional consistente, mas, embriologicamente, são glândulas labiais porque se desenvolvem como invaginações ectodérmicas do segmento labial da cabeça (CRUZ-LANDIM & MELLO, 1967; SNODGRASS, 1956). Nas abelhas adultas, as glândulas labiais descarregam sua secreção no premento da glossa estando, portanto, em condição de misturar seus produtos ao alimento ingerido. Seja por este motivo, ou porque são homólogas das glândulas salivares dos outros insetos, ou ainda porque se originam das glândulas salivares larvais, elas são consideradas as glândulas salivares propriamente ditas (SNODGRASS, 1956; CRUZ-LANDIM, 1967; SILVA DE MORAES, 2002).

Nas abelhas eussociais da subfamília Apinae, as glândulas labiais ou salivares dos adultos são formadas por um par de glândulas localizado no tórax, como nos demais insetos, e por um par localizado na cabeça, sendo estas denominadas glândulas salivares (ou labiais) da cabeça ou salivares cefálicas (GSC). Apesar de terem a mesma origem e desembocadura comuns, os pares de glândulas torácicas e cefálicas são distintos morfológica e funcionalmente. As glândulas salivares torácicas são formadas por unidades secretoras tubulares enquanto a porção cefálica é formada por unidades secretoras alveolares (CRUZ-LANDIM, 1967; ÁGREN et al., 1979; POIANI & CRUZ-LANDIM, 2010a). A secreção produzida pelas glândulas salivares do tórax é aquosa e segundo Delage-Darchen et al. (1979), Simpson (1960) e Simpson et al. (1968) contém enzimas digestivas, enquanto a secreção das glândulas salivares da cabeça tem aspecto oleoso. Segundo Heselhaus (1922) essa secreção oleosa serve para amolecer a cera durante sua manipulação na construção do ninho. Simpson (1960) pôs em dúvida a sugestão dada por Heselhaus (1922) já que nem todas as abelhas que apresentam a GSC desenvolvida trabalham com a cera e sugeriu função na lubrificação das peças bucais (SIMPSON, 1960). O questionamento de Simpson, no entanto, não levou em conta que diferentes espécies de abelhas podem usar produtos da mesma glândula para funções diversas, o que é conhecido por plasticidade funcional.

Em relação ao meliponíneos, poucas espécies foram estudadas quanto à composição química da secreção das GSC. Jarau et al. (2004, 2006) estudando a GSC de *Trigona recursa*, Schorkopf et al. (2007) analisando a mesma glândula em *Trigona spinipes* e Stangler et al. (2009) estudando a glândula de *Geotrigona mombuca*, demonstraram que as secreções produzidas pelas glândulas de operárias forrageiras contêm, respectivamente, decanoato de hexil, octanoato de octil e butanoato de farnesil, os quais através de bio-ensaios relacionaram à comunicação da localização de fontes de alimento por trilhas de cheiro. Ainda, mais recentemente, Jarau et al. (2010) demonstraram que a secreção das GSC de operárias forrageiras de *Trigona corvina* contém um leque de compostos responsáveis pela marcação de trilha de cheiro, formado principalmente por ésteres. Santos et al. (2009) atribuíram ao produto dessas glândulas em *Plebeia emerina*, auxílio no manuseio de resinas coletadas e usadas na colônia. Para *A. mellifera*, Arnold e Delage-Darchen (1978), Arnold et al. (1996) e Katzav-Gozansky et al. (2001) evidenciaram hidocarbonetos nas GSC e na superfície corpórea de *Apis mellifera*.

A morfologia, incluindo estudos histoquímicos e ultraestruturais, das GSC foram estudadas comparativamente entre diferentes fases da vida das castas e sexos de *A. mellifera* e *S. postica* (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2009, 2010a,b,c). As características encontradas, principalmente as referentes ao grau de desenvolvimento e ciclo secretor glandular foram analisadas levando em conta a função do indivíduo na colônia mostraram variações relacionadas às castas e sexos e a seus estados funcionais. As mudanças observadas foram confrontadas com as classes de indivíduos (operárias, rainhas ou machos, jovens ou exercendo as suas funções próprias na colônia) e sugeridas funções para a secreção dessas glândulas nas espécies estudadas. Contudo, as funções sugeridas foram baseadas apenas na observação do comportamento mais característico da fase da vida do indivíduo e em dados da literatura, não estando respaldadas em dados mais concretos como por exemplo a composição química da secreção das glândulas e bioensaios.

Assim sendo configura-se como primeira medida para o avanço do conhecimento nessa área a determinação da composição da secreção e a tentativa de melhor direcionar sua função dentro do contexto social. Diante disso, o presente estudo propôs-se a investigar a glândula salivar cefálica (GSC) de operárias de *A. mellifera*, *S. postica* e *M. quadrifasciata* sob enfoques que permitissem conferir algumas hipóteses ou responder às questões abaixo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral da pesquisa foi o de determinar em operárias de *A. mellifera*, *M. quadrifasciata* e *S. postica* a composição química da secreção das GSC e tentar verificar como esta poderia ser usada pelos indivíduos que a produzem, além de completar aspectos da ultraestrutura das células secretoras que ligam a sua morfologia à sua função colocando o assunto num contexto da biologia celular.

2.2. Objetivos específicos

Dentro do objetivo geral do trabalho foram desenvolvidos estudos específicos para esclarecer as seguintes hipóteses:

1. O produto das GSC (dito secreção) não é totalmente resultante da atividade secretora das células glandulares.
2. As GSC são responsáveis pela síntese de alguns dos compostos presentes na epicutícula das espécies de abelhas estudadas.
3. A composição do produto das GSC é diferente segundo a fase da vida/função dos indivíduos possibilitando seu uso em diferentes tarefas e configurando plasticidade glandular.
4. É possível separar as operárias em classes definidos levando em conta a composição química cuticular e da secreção.

3. METODOLOGIA GERAL

Em todas as espécies abordadas no presente trabalho a secreção da GSC tem aspecto visual de substância de natureza lipídica, e estudos anteriores, já citados, confirmam essa composição. Para testar a hipótese 1, estudos anteriores foram complementados com observações usando técnicas citoquímicas para lipídios e fosfatase ácida.

A abordagem para esclarecimento das demais hipóteses foi a do uso de cromatografia gasosa e espectrometria de massa para determinação da composição química e análises estatísticas para estabelecer correlação com a fase da vida e /ou função.

4. RESULTADOS

Os resultados são apresentados sob a forma de artigos destinados a testar cada uma das hipóteses, denominados capítulos, nos quais a metodologia usada está descrita detalhadamente.

Título: Detecção ultraestrutural de fosfatase ácida e lipídios em glândulas salivares cefálicas de fêmeas e machos de *Apis mellifera* e *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae).

Hipótese: O produto das glândulas salivares cefálicas (dito secreção) não é totalmente resultante da atividade secretora das células glandulares.

RESUMO: A secreção acumulada nos alvéolos das glândulas salivares cefálicas (GSC) de *Apis mellifera* e *Scaptotrigona postica* tem aspecto lipídico. Da mesma forma, as células secretoras apresentam características ultraestruturais de células produtoras de compostos lipídicos. Entretanto, diferenças inter-específicas sugerem que a composição química das secreções de ambas as espécies, as vias de produção e o ciclo secretor, diferem entre elas. Neste contexto, o presente trabalho teve por finalidade analisar citoquimicamente as GSC das castas femininas e machos de *A. mellifera* e *S. postica*, em diferentes fases da vida, usando o teste do ósmio-imidazol (OI) para lipídios e a presença de fosfatase ácida (FA) com a finalidade de detectar essas diferenças. Depósitos lipídicos foram identificados pelo OI, tanto no interior das células como na luz dos alvéolos em todos os indivíduos estudados, porém com algumas diferenças entre as espécies. As células glandulares de operárias de *A. mellifera* apresentaram marcação positiva ao OI em forma de gotículas espalhadas no citoplasma, de vesículas e nos canais formados pelas invaginações da membrana plasmática apical. No caso de *S. postica*, os compostos lipídicos marcados pelo OI apareceram em vesículas, no interior de mitocôndrias e das cisternas do retículo endoplasmático liso. Para ambas as espécies, a maior quantidade de lipídios na luz alveolar foi detectada nas glândulas das operárias trabalhando na área de cria e forrageiras. Atividade de FA só foi encontrada nas operárias de *A. mellifera* e pode estar relacionada com a modificação de material absorvido pela membrana plasmática basal, atuando no processo de elaboração da secreção ou em processo de digestão de material intracelular em vias de liberação na região apical. Nos demais indivíduos estudados, não foi identificada marcação positiva para FA. Sugere-se que a atividade de FA esteja relacionada com a função secretora e de digestão de material intracelular e absorção de material da hemolinfa.

PALAVRAS-CHAVE: Ciclo secretor. Citoquímica. Osmio-imidazol. Sistema salivar.

ABSTRACT: The secretory cells of the cephalic salivary glands (CSG) of *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* present typical ultrastructural features of cells producing lipid compounds, as well the secretion accumulated in their alveoli in is lipid-like aspect. However, previous works show inter-specific differences between the species suggesting that secretion's chemical composition, the production mechanisms and the secretor cycle, differ among them. Therefore, the present work aimed to analyse CSG of females and males of *A. mellifera* and *S. postica* in different phases of life, using imidazole-osmium (IO) for lipids and detection and presence of acid phosphatase (AP) activity to clarify those differences. Lipid deposits were

identified by IO, inside the glandular cells as in alveoli lumen in all studied individuals, however with some differences among the species. Glandular cells of workers of *A. mellifera* presented positive reaction to IO as droplets disperse in the cytoplasm, as vesicles and into the channels formed by the apical plasmic membrane invaginations. In *S. postica*, the lipid compounds were detected by the IO in vesicles, inside mitochondria and into smooth endoplasmic reticulum cisterns. In both species, the largest amount of lipids in the alveolar lumen was detected in glands of forager workers. AP was only detected in glands of *A. mellifera* workers and was attributed to activity in modification of absorbed material from hemolymph through the basal plasma membrane, in the process of secretion elaboration or in intracellular digestion of material in route to be discharged through the apical area. We suggest that the activity of those hydrolytic enzymes is related to cell's secretory activity, digestion waste material and material absorption from hemolymph.

KEYWORDS: Citochemistry. Imidazole-osmium. Salivary system. Secretory cycle.

1. INTRODUÇÃO

Todos os insetos possuem pares de glândulas exócrinas de origem epidérmica anexas aos apêndices bucais, as quais recebem denominações de acordo com o apêndice ao qual estão conectadas: glândulas mandibulares, ligadas à mandíbula; glândulas labiais ou salivares, ligadas ao lábio; etc.. Dentre estas glândulas, as glândulas salivares têm sua porção secretora localizada no tórax, porém em algumas espécies de abelhas, estas glândulas apresentam também ramos secretores na cabeça, denominados glândula salivar cefálica (ou labial cefálica). A glândula salivar cefálica (GSC) encontra-se plenamente desenvolvida e funcional nos Apinae e em algumas outras abelhas de forma incipiente (CRUZ-LANDIM, 1967).

Os produtos das glândulas exócrinas e suas funções são muito variáveis mostrando interessantes adaptações e grande plasticidade mesmo dentro da mesma espécie quando se considera as diferentes classes de indivíduos ou estados funcionais diferentes da mesma classe. Essa plasticidade funcional tem sido observada nas GSC das abelhas para as quais foram apontadas diferentes funções nas diferentes espécies como: amolecer a cera durante sua manipulação na construção do ninho (HESELHAUS, 1922), lubrificação das peças bucais (SIMPSON, 1960) e produção de componentes voláteis relacionados à comunicação por trilhas de cheiro (JARAU et al., 2004; 2006; 2010; SCHORKOPF et al., 2007; STANGLER et al., 2009).

Machos de *Bombus pratorum* e *B. lapidarius* usam a secreção de suas GSC para marcar com rotas de vôo e atrair rainhas virgens (BERGMAN & BERGSTRÖM, 1997), enquanto em outras espécies do gênero como *B. pomorum* (VALTEROVÁ et AL., 2001) e *B. mesomelas* (TERZO et al., 2007) esta função não encontra paralelo e a composição da secreção é composta por hidrocarbonetos.

As tarefas realizadas pelas operárias das abelhas eussociais obedece a uma seqüência determinada de acordo com a idade, conhecida como polietismo etário ou polifenismo. O desenvolvimento e ciclo funcional das diversas glândulas das abelhas estão diretamente associados ao seu estado fisiológico e fase da vida, ou seja, as glândulas encontram-se ativas nas fases da vida em que sua secreção é necessária para atender à determinada função ou tarefa na colônia.

Estudos morfológicos detalhados das GSC de operárias, rainhas e machos de *A. mellifera* e *S. postica* (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2009; 2010a,b,c), em diferentes fases da vida, indicam que as células glandulares nas operárias e rainhas de ambas as espécies iniciam sua atividade secretora assim que o adulto emerge, verificando-se progressivo acúmulo de secreção de aspecto oleoso na luz dos alvéolos glandulares conforme a abelha envelhece. Machos de *S. postica* apresentam desenvolvimento glandular semelhante às fêmeas de sua espécie, iniciando a produção de secreção assim que emergem e acumulando na luz alveolar até a fase de amadurecimento sexual. Entretanto, os machos de *A. mellifera* emergem com a glândula semelhante à glândula de operária recém emergida de sua espécie, porém, conforme o passar da idade, a glândula sofre regressão de modo que pouca secreção ou nenhuma é observada na luz alveolar quando atingem a maturidade sexual (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2009; 2010a,b,c).

Sabendo-se que o complexo ósmio-imidazol penetra com facilidade nas células e permite a interação da molécula de tetróxido de ósmio com os lipídios (SOARES, 1998), esta técnica mostra-se adequada para investigar as vias de absorção e/ou produção dos compostos lipídicos, assim como a distribuição e liberação da secreção das GSC, enquanto a técnica desenvolvida por Ryder e Bowen (1975) para detecção de fosfatases ácidas permite correlacionar a presença destas enzimas com o ciclo secretor. Frente aos resultados morfológicos de Poiani e Cruz-Landim que apontam para funções diferentes dessas glândulas nas duas espécies estudadas e entre as classes de indivíduos da mesma espécie, embora o aspecto da secreção seja lipídico em ambas, e visto que relatos sobre a morfologia das células secretoras apontam também para possível função excretora, o presente estudo visou obter informações que ajudassem a elucidar a natureza do produto glandular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Para os estudos ultraestruturais, foram utilizadas GSC de operárias recém emergidas (RE), trabalhando na área de cria (AC) e forrageiras (FO) de *A. mellifera* e *S. postica*, rainhas virgens (RV) e em postura (RP), machos recém emergidos (MRE) e maduros sexualmente (MS) de *A. mellifera* e machos maduros (MS) de *S. postica*, coletados no apiário e meliponário da Universidade Estadual Paulista – UNESP – em Rio Claro, mantidos pelo Instituto de Biociências.

Para ambas as espécies, as RE foram capturadas logo que emergiram da célula de cria, as AC enquanto provisionavam as células de cria ou alimentando as larvas e as FO ao voltarem da coleta para a colônia. As RV foram criadas em laboratório (LAIDLAW Jr., 1998) pelo técnico responsável pelo apiário. Os MRE e MS foram capturados no interior da colônia (*A. mellifera*) ou nos locais de agregação, como em galhos de arbustos próximos à colônia (*S. postica*).

2.2. Métodos

2.2.1. Localização de lipídios pelo método do Ósmio Imidazol (OI) (ANGERMÜLLER & FAHIMI, 1982)

As GSC de RE, AC e FO de *S. postica* e *A. mellifera* foram dissecadas em solução fisiológica para insetos e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, durante 2 horas. Após, foram lavadas 2 vezes no tampão cacodilato (15 minutos cada) e no tampão imidazol 0,1M pH 7,5 (também por 15 minutos), pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% em tampão imidazol 0,1M pH 7,5 durante 30 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Em seguida, as glândulas foram lavadas primeiramente com solução tampão imidazol 0,1M pH 7,5 por 2 vezes, em seguida em tampão fosfato salino (PBS – Phosphate-buffered saline) e por último em etanol 10%, sendo que cada lavagem durou 15 minutos. Na desidratação usaram-se concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90%, 95% e 100%), 5 minutos cada banho, sendo repetida 2 vezes a última concentração. A embebição foi feita deixando as glândulas durante 1 hora em cada uma das seguintes misturas de acetona e resina Epon Araldite, 1:1, 1:3 e resina. A inclusão foi feita em Epon Araldite com o catalisador de

polimerização em estufa a 60° por 24 horas. Cortes de aproximadamente 1µm colocados em lâminas histológicas foram corados com azul de metileno para verificação da qualidade da fixação e escolha do local de observação. Cortes ultrafinos foram postos em telinhas de cobre e contrastados primeiramente com acetato de uranila por 45 minutos e depois com citrato de chumbo por 10 minutos.

2.2.2. Localização de fosfatases ácidas (FA) (RYDER & BOWEN, 1975)

As GSC de RE, AC, FO e MS de ambas as espécies e, RV, RP e MRE de *A. mellifera* foram dissecadas em solução fisiológica para insetos e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, durante 1 hora. Em seguida foram lavadas 3 vezes em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,8, 10 minutos cada e incubadas no substrato (5mg do substrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP) em 5mL de tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,8 e 5mg de acetato de chumbo) por 45 minutos em estufa a 37°C. Incubação em meio sem p-NPP foi utilizada como controle. Em seguida os materiais foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 por 30 minutos, pós-fixados em tetróxido de ósmio de Milloning (tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4) por 1 hora a 2°C e novamente lavados 2 vezes de 10 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4. A desidratação, embebição e inclusão seguiram os mesmos passos do item anterior.

3. RESULTADOS

3.1. Localização de lipídios (OI)

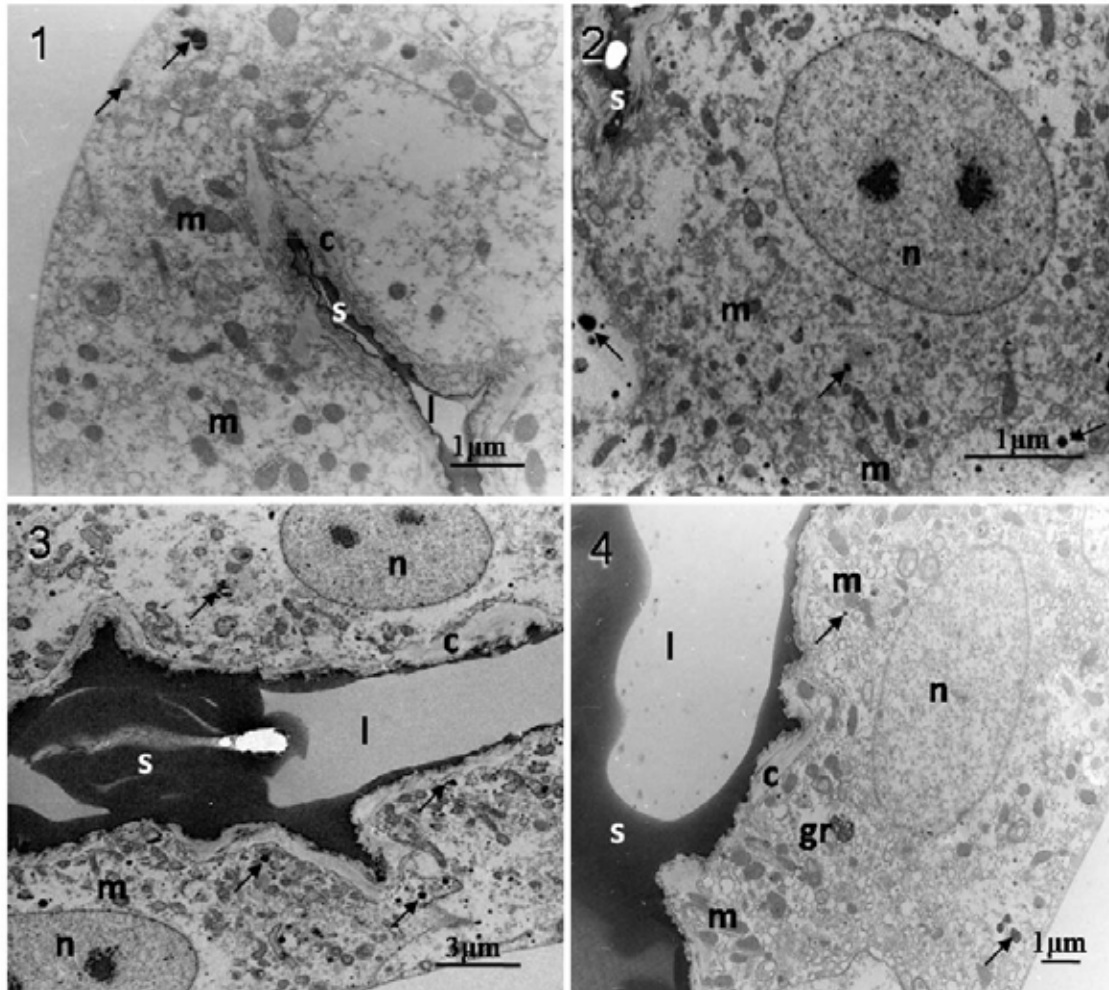
As GSC de RE, AC e FO, de ambas as espécies, tratadas com OI, revelaram algumas diferenças ultraestruturais entre as espécies e entre as fases analisadas.

3.1.1. *Apis mellifera*

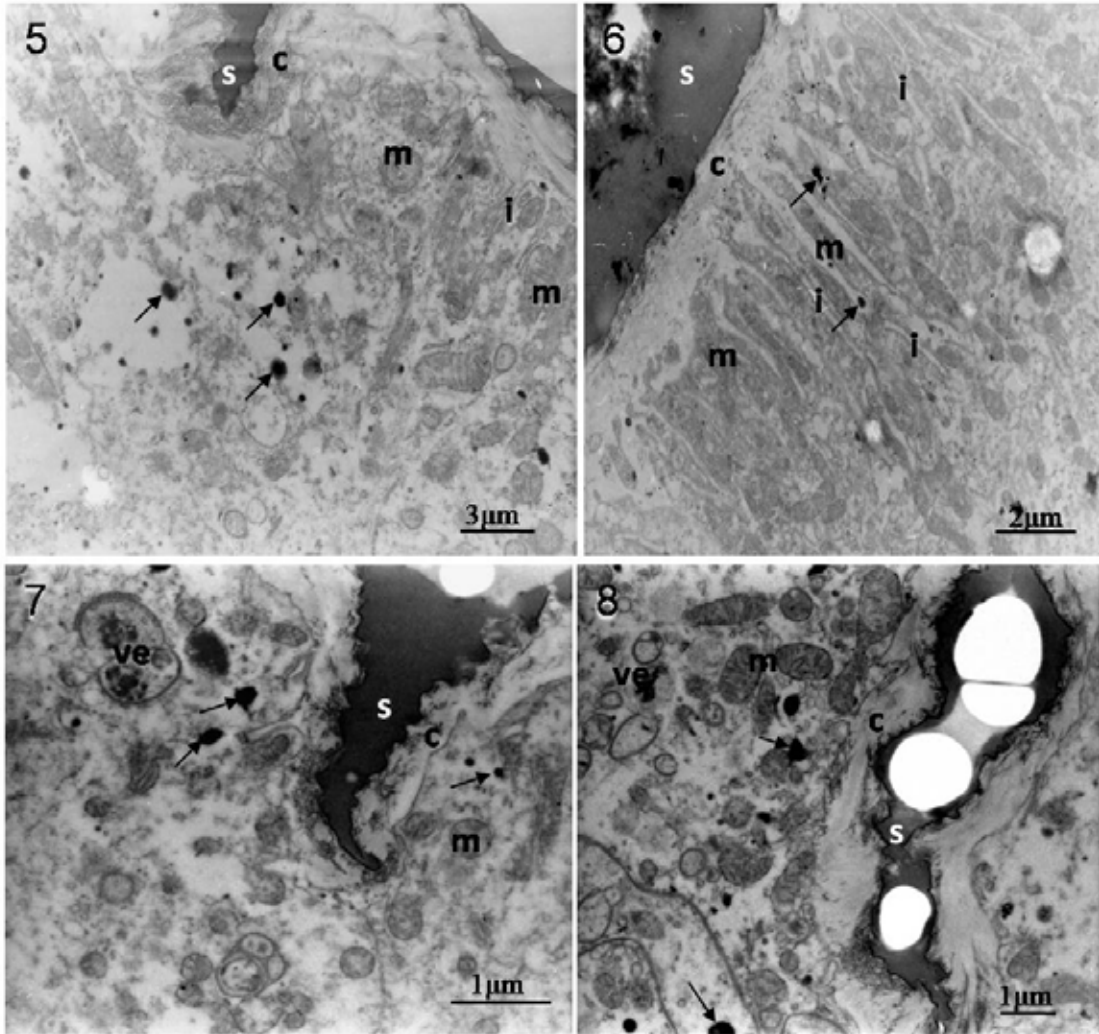
De um modo geral, à medida que a operária passa das atividades realizadas dentro da colônia para as que são realizadas fora da mesma observa-se que aumenta a positividade ao OI nas células glandulares, evidenciando, portanto o aumento progressivo da produção e/ou armazenamento de compostos lipídicos.

As células glandulares de RE de *A. mellifera* apresentam retículo endoplasmático liso, mitocôndrias de média eletrônica e núcleos com grumos de heterocromatina. A luz alveolar é estreita e contém pouca secreção. O OI destacou pequenas gotículas dispersas no citoplasma das células secretoras, nesta fase (Figuras 1 e 2).

Nas AC, além das gotículas aleatoriamente dispersas no citoplasma (Figura 3), foram observados grânulos heterogêneos (Figura 4). Tanto nesta fase quanto nas FO, a membrana plasmática apical das células glandulares invagina-se formando canais, entre os quais localizam-se mitocôndrias alongadas de média densidade eletrônica (Figuras 5 e 6). Em FO, positividade ao OI é encontrada em vesículas (Figuras 7 e 8) na região apical e também nos canais formados pelas invaginações (Figura 6). Desde a fase de AC, a luz alveolar contém grande quantidade de secreção positiva ao OI.



Figuras 1 a 4 – Detecção de lipídio pelo ósmio-imidazol em células glandulares de operárias de *Apis mellifera*. 1 e 2 – Aspecto geral da célula glandular de recém-emergidas, mostrando pouca marcação lipídica (setas), na forma de pequenas gotículas dispersas no citoplasma, mitocôndrias (m) de média elétrion-densidade e luz alveolar (l) estreita com pouca secreção (s). 3 e 4 – Glândula de operárias trabalhando na área de cria. Notar as gotículas lipídicas dispersas no citoplasma (setas) (3), grânulo heterogêneo (gr) (4) e grande quantidade de lipídios (s) na luz (l) do alvéolo. c = cutícula; n = núcleo.



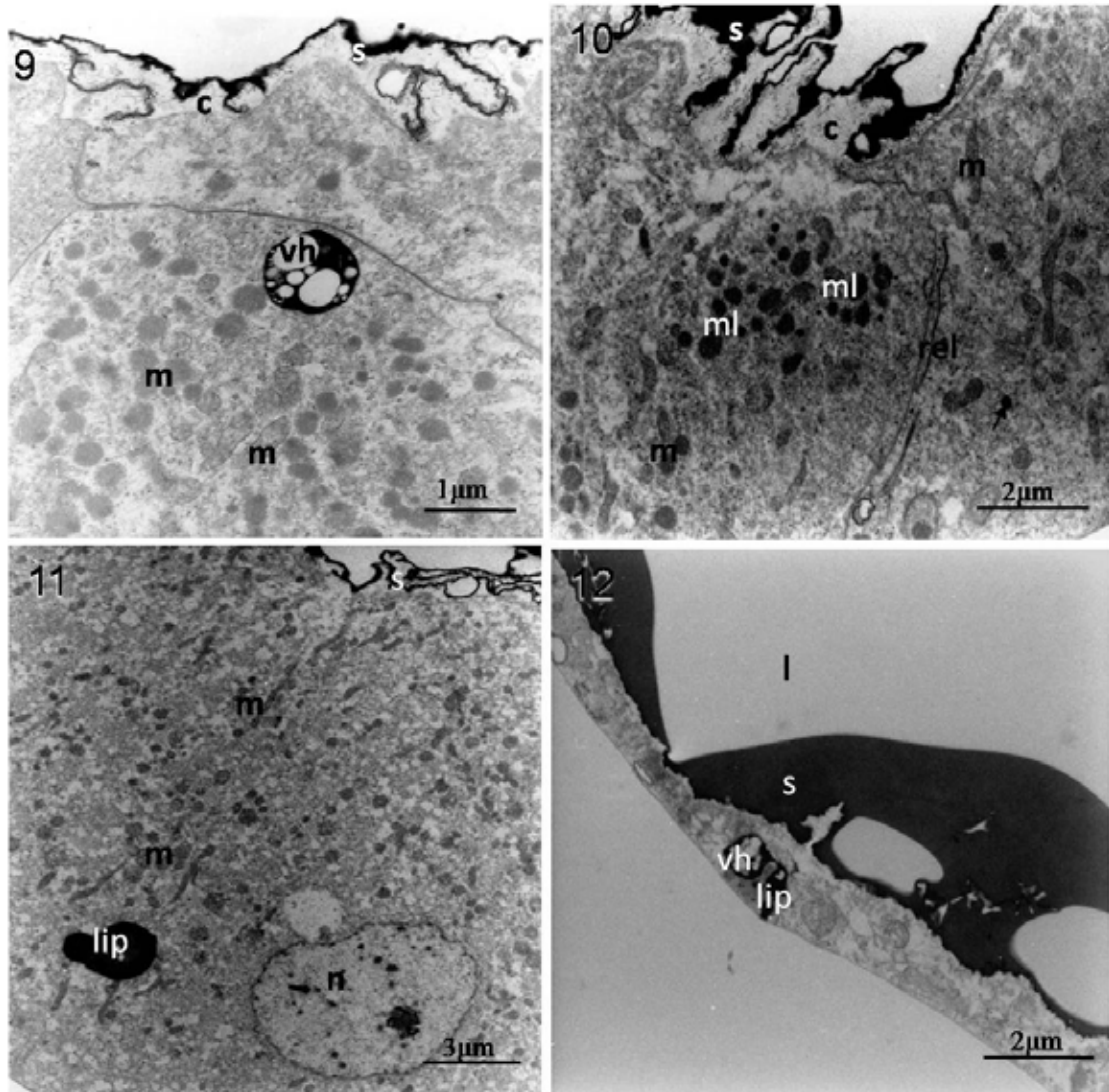
Figuras 5 a 8 - Detecção de lipídio pelo ósmio-imidazol em células glandulares de operárias de *Apis mellifera*. 5 e 6 – Glândula de operárias trabalhando na área de cria (5) e forrageira (6) evidenciando gotículas lipídicas dispersas na região apical (seta), invaginações (i) da membrana apical, formando canais entre os quais encontram-se mitocôndrias (m). Em 6, notar presença de gotículas lipídicas nos canais apicais (setas). 7 e 8 – Marcações positivas ao ósmio-imidazol distribuídas no citoplasma (setas) e em vesículas (ve) nas glândulas de forrageiras. c = cutícula; s = secreção.

3.1.2. *Scaptotrigona postica*

As células glandulares de RE apresentam pouca reação positiva ao tratamento com OI, a qual aparece sob a forma de vesículas e de pequena camada elétron-densa sobre a cutícula que limita o lúmen alveolar (Figura 9). Como observado em *A. mellifera*, as marcações positivas para o OI se intensificam nas células glandulares de AC (Figura 10), mas diferentemente nas FO, pouca marcação é encontrada nas células, embora a luz alveolar encontre-se cheia de secreção.

Nas AC algumas mitocôndrias parecem reagir positivamente ao OI evidenciando conteúdo lipídico em seu interior. Cisternas do retículo endoplasmático liso contêm material positivo ao tratamento, apresentando a mesma eletron-densidade observada nas mitocôndrias e na luz do alvéolo (Figura 10).

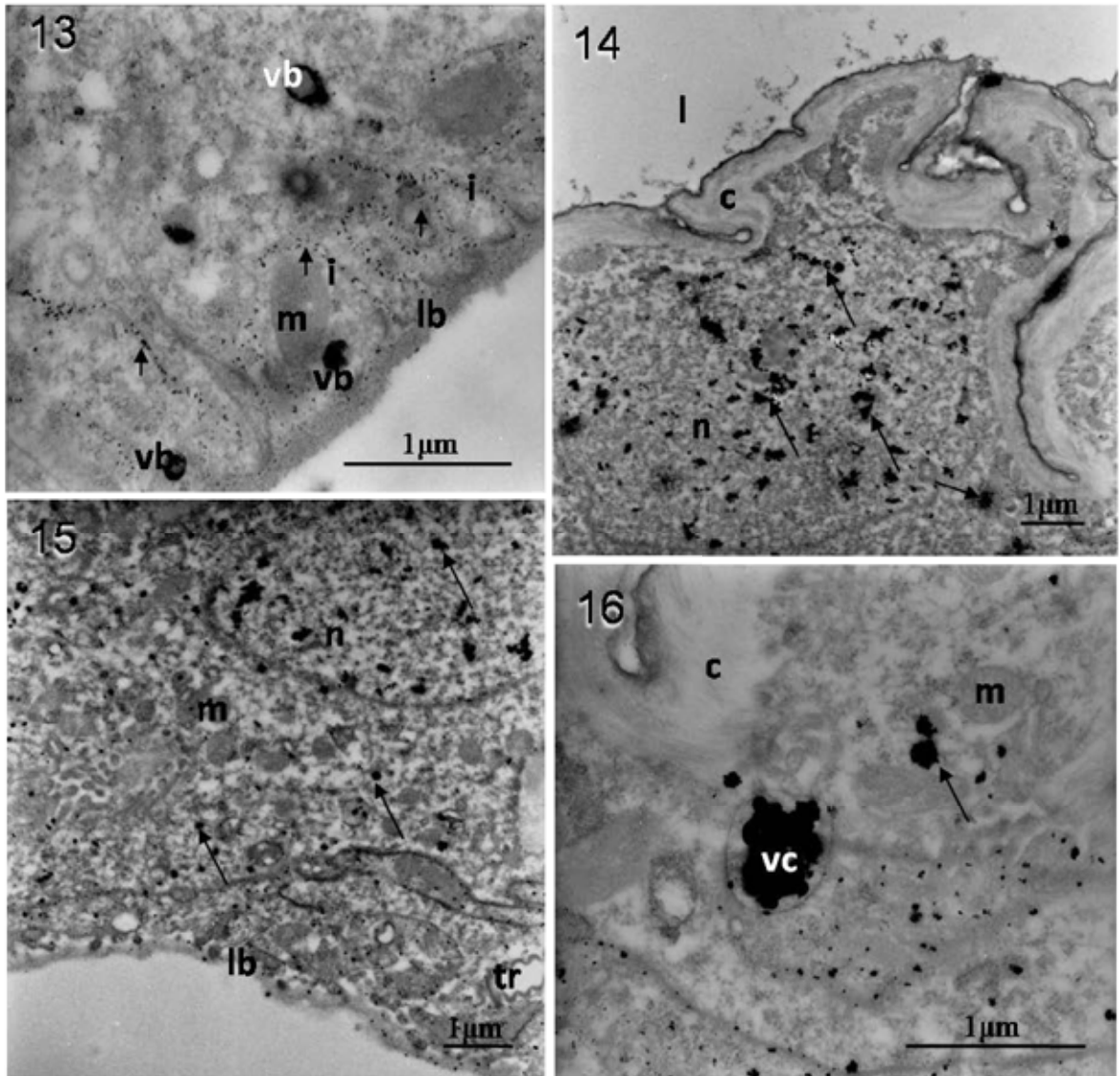
No grupo das FO, alguns alvéolos possuem ainda células cúbicas, as quais apresentam grandes gotas eletron-densas no citoplasma (Figura 11). A maior parte dos alvéolos, entretanto, é constituída por células achatadas, e alguma reação positiva ao OI aparece no citoplasma destas células, mas principalmente na luz alveolar a qual é ampla e repleta de secreção acumulada (Figura 12). Nesta fase da operária, poucas organelas foram observadas nas células glandulares.



Figuras 9 a 12 - Detecção de lipídio pelo ósmio-imidazol em células glandulares de *Scaptotrigona postica*. 9 e 10 – Glândula de operária trabalhando na área de cria. 9 - Vesícula contendo material heterogêneo (vh) na região apical. Mitocôndrias (m) são abundantes e variam quanto a elétron-densidade e formato. 10 - Observar pequenas gotas positivas ao ósmio-imidazol (seta). Além das cisternas do retículo endoplasmático liso (rel), algumas mitocôndrias parecem positivas ao tratamento, evidenciando conteúdo lipídico em seu interior (ml). 11 e 12 – Glândula de operária forrageira. 11 – Célula glandular cúbica, apresentando grande gota lipídica (lip) eletron-densa. 12 – Célula glandular achatada, com marcação lipídica (lip) em forma de gota e vesícula heterogênea (vh). Notar ampla luz alveolar (l) acumulando secreção (s). c = cutícula; m = mitocôndria; n = núcleo; s = secreção.

3.2. Localização de fosfatases ácidas (FA)

O tratamento das GSC com o substrato p-NPP revelou positividade para FA apenas nas células glandulares de operárias de *A. mellifera*. Nas RV e MRE de *A. mellifera* e MS de ambas espécies não foi encontrada marcação para FA. Nas GSC de RE, AC e FO de *A. mellifera* a marcação positiva para FA ocorreu sob a forma de uma espécie de pó fino acompanhando as invaginações da membrana plasmática basal (Figura 13). Em regiões heterocromáticas do núcleo (Figuras 14 e 15), dispersa no citoplasma e em pequenas vesículas nas regiões apicais e basais das células (Figuras 13, 15 e 16).



Figuras 13 a 16 – Detecção de atividade de fosfatase ácida nas glândulas de *Apis mellifera*. 13 - Reação positiva com aspecto de pó fino (setas) acompanhando as invaginações (i) da membrana plasmática basal e em pequenas vesículas (vb). Marcação positiva (setas) encontrada no núcleo (n) e em pequenos grupos dispersos pelo citoplasma, na região apical (14) e basal (15). Notar em 16 a presença de vesícula fortemente reativa ao substrato (vc). c = cutícula; l = luz; lb = lâmina basal; m = mitocôndria; tr = traqueíola.

4. DISCUSSÃO

Em operárias de *A. mellifera* e *S. postica*, a técnica citoquímica para detecção de material lipídico nas GSC através de pós-fixação do material com tetróxido de ósmio em tampão imidazol evidenciou a presença de material positivo no citoplasma, sob várias formas e com várias localizações: vesículas, gotículas, no interior das cisternas do retículo endoplasmático liso, em pequenas vesículas acompanhando as invaginações na membrana plasmática apical. Cada uma destas situações tem um significado, como será explicado adiante.

A morfologia das células das glândulas de operárias de *A. mellifera* é sugestiva de que suas células possam absorver compostos da hemolinfa através das invaginações da membrana plasmática basal e que estes compostos cheguem até a luz passando a fazer parte da secreção. Os lipídios que são excretados passando pelo interior da célula podem ou não ser modificados e adquirirem composição diferente daquela de quando presentes na hemolinfa. As vesículas e pequenas gotículas presentes no citoplasma correspondem a lipídios acumulados na célula e provavelmente nela sintetizados. Aqueles no interior do retículo endoplasmático liso encontram-se circulando no sistema reticular da célula e podem ter origem exógena conforme verificado nas glândulas de Dufour de rainhas de *Bombus terrestris* (HEFETZ et al., 1996; ABDALLA et al., 1999a,b) e *A. mellifera* (KATZAV-GOZANSKY et al., 2000) e GSC de *A. mellifera* (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2009). Os lipídios no interior das invaginações da membrana plasmática apical parece estarem em vias de serem eliminados.

Em alguns insetos, principalmente em Collembola que não têm túbulos de Malpighi, as glândulas salivares têm papel excretor (HOUSE & GINSBORG, 1985). Em abelhas algumas características morfológicas como a presença de invaginações da membrana plasmática basal semelhantes às observadas nos túbulos de Malpighi e túbulos contornados do néfron de vertebrados sugerem que também tenham essa função, principalmente nas FO, quando as invaginações são mais proeminentes.

As células glandulares de *S. postica* não apresentam invaginações da membrana basal, o que levanta a possibilidade de que não acumulem a função de secreção com a excretora. O fato das células dos alvéolos das glândulas das campeiras se encontrarem muito achatadas, indicando fim da fase ativa (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2009) está de acordo com essa interpretação. Em *A. mellifera* as células permaneceriam funcionais nas campeiras, mas principalmente como órgãos excretores. As análises químicas das secreções glandulares de *A. mellifera* e *S. postica* (Capítulos 4.2 e 4.3 desta tese) corroboram a sugestão de diferentes

funções dessa glândula nas duas espécies, já que foram encontradas diferenças significativas quanto aos compostos químicos constituindo a secreção glandular.

Estudos anteriores apontaram que as fosfatases estão relacionadas a diferentes processos celulares além da digestão intracelular, tais como secreção, autofagia (SKELTON & BOWEN, 1987; COSTA & CRUZ-LANDIM, 2000; 2001) e morte celular (KOCH & KING, 1969; LOCKSHIN, 1969; BOWEN & BOWEN, 1990; BÜNING, 1994; CAVALCANTE, 1998; SILVA DE MORAES, 1998).

Costa e Cruz-Landim (2001) utilizaram o p-NPP como substrato na detecção de fosfatase ácida em células glandulares hipofaríngeas de *S. postica* e verificaram que o material positivo apresentava-se no citoplasma das células, na forma de granulação fina sem relação específica com nenhuma organela.

Apenas as operárias de *A. mellifera* apresentaram reação positiva para fosfatase ácida em suas células glandulares. As fosfatases encontradas nas regiões apicais e basais devem estar relacionadas com a modificação de material absorvido pela membrana plasmática basal, atuando no processo de elaboração da secreção ou em processo de digestão de material intracelular em vias de liberação na região apical.

Foi também observada marcação de FA no núcleo das células glandulares de operárias de *A. mellifera*. Alguns trabalhos já relataram a presença dessas enzimas no núcleo (LOVE et al., 1969; SORIANO & LOVE, 1971; VOLBRODT, 1974; BUCHWALOW & UNGER, 1977), porém sua função não está totalmente esclarecida. Muitos autores são de opinião de que a reação positiva para FA no núcleo não têm significado funcional e sugerem tratar-se de artefato de técnica, enquanto Cruz-Landim et al. (2002) acreditam que as mesmas possam indicar fases nucleares funcionais específicas, visto que o fenômeno é freqüente em vários tipos de tecidos e com substratos para detecção da enzima diferentes.

Já que positividade para FA ocorre em todas as fases das operárias de *A. mellifera* e, aceitando-se a sugestão de Cruz-Landim et al. (2002), pode-se concluir que a glândula é funcional durante toda a vida da operária o que condiz com a ultraestrutura das células glandulares de operárias nesta espécie (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2009) na qual a produção de secreção ocorre durante toda a vida da operária e acumula-se progressivamente na luz dos alvéolos atingindo grau máximo quando a operária passa a executar as tarefas de campo (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2010b).

Portanto, os presentes resultados demonstram que o funcionamento das GSC é diferente nas operárias destas duas espécies, seja quanto à maneira de armazenar a secreção

no seu citoplasma, seja quanto ao ciclo secretor, o qual em *S. postica* se interrompe nas forrageiras, enquanto prossegue em *A. mellifera*.

Diferença entre as espécies também ocorre quanto à hipótese formulada de que o produto final da glândula não é totalmente de origem endógena, mas obtido diretamente da hemolinfa. Em *S. postica* a morfologia celular e a citoquímica refutam a hipótese de que as GSC tenham também um papel excretor, enquanto essa função encontra respaldo em *A. mellifera*. Assim, nesta última espécie o produto final da glândula consistiria de material secretado mais material excretado, abrindo a possibilidade de substâncias lipídicas absorvidas do alimento ingerido serem eliminadas via glândula.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, F.C.; VELTHUIS, W.W.H.; CRUZ-LANDIM, C. & DUCHATEAU, M.J. Changes in the morphology and ultrastructure of the Dufour's gland during the life cycle of the bumble bee queen, *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Bombini). **Neth. J. Zool.**, v.49, p.251-261, 1999a.

ABDALLA, F.C.; VELTHUIS, W.W.H.; DUCHATEAU, M.J. & CRUZ-LANDIM, C. Secretory cycle of the Dufour's gland in workers of bumble bee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Bombini). **Neth. J. Zool.**, v.49, p.139-156, 1999b.

ANGERMÜLLER, S. & FAHIMI, D.H. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochem. J.**, v.14, p.823-825, 1982.

BERGMAN, P. & BERGSTRÖM, G. Scent marking, scent origin, and species specificity in male pre-mating behavior of two scandinavian bumblebees. **J. Chem. Ecol.**, v.23, n.5, p.1235-1251, 1997.

BOWEN, I.D. & BOWEN, S.M. **Programmed Cell Death in Tumors and Tissues**. London: Chapman & Hall, 1990.

BUCHWALOW, I.B. & UNGER, E. Enzyme activity of nuclear ribonucleoproteins. **Exp. Cell Res.**, v.106, p.139-152, 1977.

BÜNING, J. **The insect ovary: structure, previtellogenic growth and evolution**. London: Chapman & Hall, 1994.

CAVALCANTE, V.M. **Reorganização do intestino médio em *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose: estudos ultra-estruturais e citoquímicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998. p.135.

COSTA, R.A.C. & CRUZ-LANDIM, C. Comparative study of the ultrastructural and secretory dynamic of hypopharyngeal glands in queens, workers and males of *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Biocell**, v.24, p.39-48, 2000.

COSTA, R.A.C. & CRUZ-LANDIM, C. Distribution of acid phosphatases in the hypopharyngeal glands from workers, queens and males of a Brazilian stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille: An ultrastructural cytochemistry study. **Histochem. J.**, v.33, p.653-662, 2001.

CRUZ-LANDIM, C. Estudos comparativos de algumas glândulas das abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. **Arq. Zool. S. Paulo**, v.15, p.177-290, 1967.

CRUZ-LANDIM, C.; REGINATO, R.D.; SILVA DE MORAES, R.L.M. & CAVALCANTE, V.M. Cell nucleus activity during post-embryonic development of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Intranuclear acid phosphatase. **Genet. Mol. Res.**, v.1, n.2, p.131-138, 2002.

HEFETZ, A.; TAGHIZADEH, T. & FRANCKE, W. The exocrinology of the Queen bumble bee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae, Bombini). **Z. Naturforsch**, v.51C, p.406-422, 1996.

HESELHAUS, F. Die Hautchüsen der Apiden und Verwandter formen. **Zool. Jahrb. Jena Abt. J. Anat.**, v.43, p.363-464, 1922.

HOUSE, C.R. & GINSBORG, B.L. Salivary gland. In: KERKUT, G.S. & GILBERT, L.J. (Eds.). **Comparative Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, v.11, 1985.p.195-224.

JARAU, S.; HANCIR, M.; ZUCCHI, R. & BARTH, F.G. A Stingless Bee Uses Labial Gland Secretions for Scent Trail Communication (*Trigona recursa* Smith, 1863). **J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav Physiol.**, v.190, n.3, p.233-239, 2004.

JARAU, S.; SCHULZ, C.M.; HRNCIR, M.; FRANCKE, W.; ZUCCHI, R.; BARTH, F.G. & AYASSE, M. Hexyl decanoate, the first trail pheromone compound identified in a stingless bee, *Trigona recursa*. **J. Chem. Ecol.**, v.32, p.1555-1564, 2006.

JARAU, S.; DAMBACHER, J.; TWELE, R.; AGUILAR, I.; FRANCKE, W. & AYASSE, M. The trail pheromone of a stingless bee, *Trigona corvine* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), varies between population. **Chemical Senses**, v.35, n.7, p.593-601, 2010.

KATZAV-GOZANSKY, T.; SOROKER, V. & HEFETZ, A. Plasticity in caste-related exocrine secretion biosynthesis in the honey bee (*Apis mellifera*). **J. Insect Physiol.**, v.46, p.993-998, 2000.

KOCH, E.A. & KING, R.C. Further studies on the ring canal system of the ovarian cystocytes of *Drosophila melanogaster*. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, v.102, p.129-152, 1969.

LIDLAW JR., H.H. **Criação contemporânea de rainhas**. Canoas: La Salle. 1998. 219p.

LOCKSHIN, R.A. Lysosomes in insects. In: DINGLE, J.T. et al. (Eds.). **Lysosomes in biology and pathology, v.6. Lysosomes in applied biology and therapeutics.** London: North Holland, 1969.

LOVE, R.; STUDZINSKI, G.P. & WALSH, R.J. Nuclear nucleolar and cytoplasmic acid phosphatases in cultured mammalian cells. **Exp. Cell Res.**, v.58, p.62:72, 1969.

POIANI, S.B. & CRUZ-LANDIM. Cephalic salivary gland ultrastructure of worker and queen eusocial bees (Hymenoptera, Apidae). **Animal Biology**, v.59, p.299-311, 2009.

POIANI, S.B. & CRUZ-LANDIM, C. Morphological changes in the cephalic salivary glands of females and males of *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Biosciences**, v.35, n.2, p., 2010a.

POIANI, S.B. & CRUZ-LANDIM, C. Changes in the size of cephalic salivary glands of *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae) queens and workers in different life phases. **Zoologia**, v.27, n.6, p. 961-964, 2010b.

POIANI, S.B. & CRUZ-LANDIM, C. Cephalic salivary glands of two species of advanced eusocial bees (Hymenoptera: Apidae): morphology and secretion. **Zoologia**, v.27, n.6, p.979-985, 2010c.

RYDER, T.A. & BOWEN, I.D. A method for fine structural localization of acid phosphatase activity using p-nitrophenyl phosphate as substrate. **J. Histochem Cytochem.**, v.23, n.3, p.235-237, 1975.

SCHORCOPF, D.L.P.; JARAU, S.; FRANCKE, W.; TWELE, R.; ZUCCHI, R.; HRNCIR, M.; SCHMIDT, V.M.; AYASSE, M. & BARTH, F.G. Spitting out information: *Trigona* bees deposit saliva to signal resource locations. **Proc. R. Soc. B.**, v.274, p.895-898, 2007.

SILVA DE MORAES, R.L.M. **Morte celular nas glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae).** Tese (Livre Docência em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998. 97p.

SIMPSON, J. The Functions of the Salivary Glands of *Apis mellifera*. **J. Insect Physiol.**, v.4, n.2, p.107-121, 1960.

SKELTON, J.K. & BOWEN, I.D. The cytochemical localization and backscattered electron imaging of acid phosphatase and cell death in the midgut of developing *Calliphora vomitoria* larvae. **Epithelia**, v.1, p.213-223, 1987.

SOARES, M.J. Detecção de lipídios. In: SOUZA, W. (Ed.). **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas.** 1ed. Rio Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia, 179p. 1998.

SORIANO, R.Z. & LOVE, R. Electron microscopic demonstration of acid phosphatase in nucleoli and nucleoplasm. **Exp. Cell Res.**, v.65, p.467-470, 1971.

STANGLER, E.S.; JARAU, S.; HRNCIR, M.; ZUCCHI, R. & AYASSE, M. Identification of trail pheromone compounds from the labial glands of the stingless bee *Geotrigona mombuca*. **Chemoecology**, v.19, p.13-19, 2009.

TERZO, M.; VALTEROVÁ, I. & RASMONT, P. Atypical secretions of the male cephalic labial glands in bumblebees: the case of *Bombus (Rhodobombus) mesomelas* Gerstaecker (Hymenoptera, Apidae). **Chemistry and Biodiversity**, v.4, p.1466-1471, 2007.

VALTEROVÁ, I.; URBANOVÁ, K.; HOVORKA, O. & KINDL, J. Composition of the Labial Gland Secretion of the Bumblebee Males *Bombus pomorum*. **Zeitschrift für Naturforschung (Tübingen)**, v.56(c), p.430-436, 2001.

VOLBRODT, A. Cytochemistry of nuclear enzymes. In: BUSH, H. (Ed.). **The cell nucleus**. Academic Press, New York and London, pp.344-399, 1974

Título: Seriam as glândulas salivares cefálicas de operárias de *Apis mellifera* e *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae) fontes de hidrocarbonetos cuticulares?

*Hipótese: As glândulas salivares cefálicas são responsáveis pela síntese de parte dos compostos presentes na epicutícula de *Apis mellifera* e *Melipona quadrifasciata*.*

RESUMO: A origem dos compostos de superfície nas abelhas adultas não está totalmente elucidada. Os enócitos e glândulas exócrinas de origem ectodérmica têm sido apontados como as principais fontes de compostos cuticulares. Dentre as glândulas exócrinas das abelhas adultas, as glândulas salivares cefálicas (GSC) apresentam ultraestrutura compatível com a produção de compostos lipídicos os quais poderiam vir a contribuir para a composição do perfil cuticular. Desta forma, tanto a secreção da GSC quanto a superfície cuticular de operárias de *Apis mellifera* e *Melipona quadrifasciata* em diferentes fases da vida (recém emergidas, trabalhando na área de cria e forrageando) foram analisadas quimicamente através de cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas. Os resultados revelaram que os hidrocarbonetos são os principais constituintes tanto da secreção glandular quanto dos compostos da superfície cuticular nas duas espécies estudadas. Além dos hidrocarbonetos, compostos oxigenados também foram identificados fazendo parte do perfil químico cuticular e da secreção glandular de ambas as espécies. Os ésteres são o segundo grupo de compostos químicos mais abundantes na secreção glandular de operárias de *M. quadrifasciata*. Os compostos cuticulares e glandulares variam conforme a fase da vida da operária em ambas as espécies. A correspondência entre os compostos glandulares e cuticulares em ambas as espécies sugere a participação das GSC na formação e reposição dos compostos cuticulares.

PALAVRAS-CHAVE: Abelha. Análise química. Cromatografia em fase gasosa. Glândula labial.

ABSTRACT: The origin of surface cuticular compounds in adult bees is not completely elucidated. The oenocytes and the exocrine glands originated from ectoderme have been pointed as the main sources of cuticular compounds. Among the exocrine glands of adult bees, the cephalic salivary glands (CSG) present ultrastructural features compatible with the lipid compounds production which could come to contribute with cuticular chemical profile. This way, the CSG secretion and cuticular surface of workers in different phases of the life (newly emerged, working at combs area and foragers) of *Apis mellifera* and *Melipona quadrifasciata* were analyzed chemically by gas chromatography-mass spectrometry. The results revealed that the hydrocarbons are the main compounds on cuticular surface and glandular secretion in the two studied species. Besides the hydrocarbons, oxygenated compounds were also identified being part of the cuticular chemical profile and glandular secretion of both species. The esters are the second chemical group more abundant in glandular secretion of workers of *M. quadrifasciata*. The cuticular and glandular compounds vary according to the phase of the worker's life in both species. The correspondence between

glandular and cuticular compounds in both species suggests the CSG participation in cuticular chemical profile formation and replacement of compounds.

KEYWORDS: Bee. Chemical analysis. Gas chromatography. Labial glands.

1. INTRODUÇÃO

A cutícula dos insetos é constituída por três camadas: uma mais externa, chamada epicutícula; outra intermediária denominada exocutícula; e mais internamente a endocutícula. O principal constituinte da epicutícula é a cuticulina, uma lipoproteína (LOCKE, 1964). A epicutícula consiste de quatro camadas distintas das quais a mais superficial é trilamelar e constituída por lipídios altamente polimerizados, ou seja, por ceras. Nesta camada, estão presentes em todos os insetos, hidrocarbonetos que podem chegar a constituir 90% de sua composição, cujas cadeias variam de 12 a 50 átomos de carbono. Esta camada de cera tem como função primordial a proteção contra a perda de água pelo tegumento (BLOMQUIST & DILLWITH, 1985; LOCKEY, 1988; RENOBLES et al., 1988; CHAPMAN, 1998), porém durante o processo evolutivo, os compostos da cera passaram a ter função também na comunicação, atuando como pistas para reconhecimento dos membros da espécie, de comportamentos relacionados à corte e ao acasalamento e nas espécies sociais na manutenção e regulação das relações sociais como a discriminação entre companheiros e não companheiros de ninho, reconhecimento de castas, identificação de seu estado fisiológico ou função dentro da espécie ou do ninho, tais como dominância ou fertilidade (HOWARD, 1993; RUTLER et al., 1998, 2002; KATZAV-GOZANSKY et al., 2000; DANI et al., 2001). Os hidrocarbonetos responsáveis pelas pistas de reconhecimento abrangem alcanos, alcenos e alcanos com ramificações (PFENNING et al., 1983; BREED & STILLER, 1992; SINGER & SPELIER, 1992; GAMBOA et al., 1996).

Cada indivíduo possui seu próprio perfil de compostos cuticulares, que constitui uma assinatura química individual, mas o perfil de hidrocarbonetos cuticulares é também característico para o grupo de insetos e nos sociais para espécies e colônias, podendo ainda variar dentro destas de acordo com a idade, casta ou sexo dos indivíduos (BLOMQUIST et al., 1998; MONNIN & PEETERS, 1999; SLEDGE et al., 2001). Os hidrocarbonetos podem ter origem endógena, ou seja, serem produzidos pelo próprio indivíduo, caracterizando uma origem genética; ou apresentar uma origem exógena, sendo adquiridos a partir do meio externo (CARLIN, 1989; LORENZI et al., 1996).

A fonte primária dos compostos de origem genética são os enócitos e provavelmente também, nos imaturos, as próprias células epidérmicas (KRAMER & WIGGLESWORTH, 1950; WIGGLESWORTH, 1965, 1970; DIEHL, 1973, 1975; CHINO, 1985; GU et al., 1995) e nos adultos, glândulas tegumentares da classe III (GUERINO, 1999). Os compostos cuticulares de origem exógena utilizados no reconhecimento podem provir de diversas fontes, dentre elas o alimento (*Formica*: LANGE, 1960; *Solenopsis invicta*: OBIN & VANDER MEER, 1988; *Linepithema humile*: LIANG & SILVERMAN, 2000) e materiais utilizados na construção do ninho (*Bombus*: FREE, 1961; *Pogonomirex badius*: HANGARTNER et al., 1970; *Solenopsis invicta*: HUBBARD, 1974; *Polistes*: GAMBOA, 1996).

Os enócitos são de origem ectodérmica assim como as células epidérmicas. Estas últimas, no adulto, encontram-se inativas a não ser em determinadas regiões glandulares. Deste modo, além das glândulas exócrinas tegumentares da classe III, todas as glândulas de origem ectodérmica, as tegumentares da classe I e as glândulas exócrinas estruturadas como órgãos (CRUZ-LANDIM, 1994) têm potencial para contribuir com a sua secreção para a formação dos compostos de superfície. De fato, as glândulas salivares cefálicas (GSC) e a de Dufour têm sido apontadas como fonte desses hidrocarbonetos (KULLENBERG et al., 1973; HEFETZ et al., 1979; OLDHAM et al., 1994; BERGMAN & BERGSTRÖM, 1997; DANI et al., 1996, 2001).

A função da secreção das GSC nas abelhas não está totalmente elucidada e provavelmente varia com a espécie, casta, sexo e função da abelha. Em *Apis mellifera*, segundo Heselhaus (1922), a secreção da GSC teria a função de amolecer a cera durante sua manipulação na construção do ninho. Para Simpson (1960), a finalidade seria a lubrificação das peças bucais. Outros trabalhos apontam a secreção produzida por estas glândulas, como feromônio utilizado para marcação de trilha de forrageamento (JARAU et al., 2004; 2006; 2010; SCHORKOPF et al., 2007; STANGLER et al., 2009).

Os compostos de superfícies sofrem desgaste e são constantemente renovados. Embora os enócitos sejam apontados como sua principal fonte da parte endógena destes compostos, fontes adicionais não podem ser totalmente descartadas. Tendo em vista que as células das GSC de *A. mellifera* apresentam morfologia e ultraestrutura de células produtoras de compostos lipídicos (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2009; 2010a,b,c) é possível que sua secreção contenha constituintes cuticulares e contribua para a manutenção destes, como sugerido por Kullenberg et al. (1973) e Bergman e Bergström (1997) ao estudarem as GSC de

Bombus e Hefetz et al. (1979), Oldham et al. (1994) e Dani et al. (1996, 2001) ao estudarem a glândula de Dufour em algumas abelhas e vespa. Deste modo, mesmo havendo relatos de que em algumas espécies de meliponíneos essa função não lhes possa ser atribuída e tendo sido verificado que em *S. postica* (Capítulos 4.3 e 4.4 desta tese) isso não ocorre, o presente estudo teve por objetivos traçar o perfil químico da superfície cuticular e da secreção das GSC de operárias de *A. mellifera* e *Melipona quadrifasciata* em diferentes fases da vida e correlacionar os dados encontrados (compostos glandulares e de superfície) com a finalidade de verificar se glândula poderia contribuir para a reposição dos constituintes cuticulares de origem endógena.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Operárias de *A. mellifera* e *M. quadrifasciata* foram coletadas em diferentes fases da vida para a realização da técnica de cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa (CG-EM):

- Operárias recém emergidas (RE): capturadas ao emergirem da célula de cria;
- Operárias trabalhando na área de cria (AC): capturadas enquanto provisionavam as células de cria ou trabalhando no favo (operando células, construindo favo);
- Operárias forrageiras (FO): capturadas ao voltarem para a colônia com material coletado em suas pernas traseiras.

Os indivíduos foram coletados no apiário e meliponário da Universidade Estadual Paulista – UNESP – em Rio Claro, mantidos pelo Instituto de Biociências.

2.1.1. *Apis mellifera*

Foram utilizados 12, 11, e 14 pares de glândulas de RE, AC e FO, respectivamente, para a análise da secreção glandular, enquanto que 10, 15 e 15 pares de asas foram utilizados para caracterizar o perfil químico da superfície cuticular de RE, AC e FO, respectivamente. Os indivíduos foram retirados de uma única colônia do apiário.

2.1.2. *Melipona quadrifasciata*

Foram coletadas 10 operárias de *M. quadrifasciata* em cada uma das fases da vida mencionadas acima (RE, AC e FO) das quais foram dissecadas as glândulas e pares de asas.

2.2. Métodos

2.2.1. *Apis mellifera*

As análises químicas da secreção das GSC e asas foram conduzidas no Centro de Estudo de Insetos Sociais – CEIS, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro. As GSC e os pares de asas foram dissecados e postos individualmente em frascos contendo 100µL de hexano para extração dos compostos. As glândulas não foram retiradas dos frascos, porém as asas foram retiradas após 30 minutos. Foram retirados 30µl de cada solução e acondicionados em outro frasco. De cada um dos frascos contendo 30µl foi injetado 1µl no CG-EM (SHIMADZU, modelo GCMS-QP2010, equipado com coluna DB-5MS 30m) em modo *splitless*. O protocolo de temperatura usado foi: temperatura inicial de 120°C, aumentando até 300°C a uma taxa de 7°C/minuto permanecendo nesta temperatura final de 300°C por 10 minutos. Foi utilizado Hélio como gás carreador a uma taxa constante de 1.6ml/min.

Foi feita uma curva de calibração para identificação dos hidrocarbonetos, usando-se o mesmo protocolo de temperatura. Foram injetados 1ppm, 2ppm e 5ppm de hidrocarbonetos que variaram de C16 a C31. Deste modo, a curva de calibração detectou os hidrocarbonetos existentes nas secreções glandulares e asas e a quantia dos mesmos. O uso da quantidade “traço” foi dado quando a quantia do composto apresentou-se abaixo da curva de calibração, apesar do composto ter sido detectado (limite de detecção) a quantia não foi suficiente para ser quantificada (limite de quantificação). O limite de detecção é maior que o limite de quantificação. Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do programa GCMSolutions for Windows (Shimadzu Corporation). A identificação dos compostos foi realizada através dos compostos injetados para a curva de calibração, além de comparações dos espectros de massas com a biblioteca Wiley.

Após identificação dos compostos glandulares e de superfície, foi aplicada análise de correspondência (BENZÉCRI, 1973; GREENACRE, 1984; LANDIM, 2011) utilizando-se o programa XLSTAT 2010.

2.2.2. *Melipona quadrifasciata*

As análises químicas foram conduzidas durante estágio de 6 meses no Lennard-Jones Laboratories junto ao Chemical Ecology Group na Keele University, United Kingdom, sob a supervisão do Dr. E.D. Morgan e Dr. F.P. Drijfhout. Usou-se um aparelho de cromatografia em fase gasosa (Hewlett-Packard 6890) equipado com coluna HP-5MS (30 metros de comprimento, 0.25mm de diâmetro). O cromatógrafo está acoplado diretamente a um 5973 Detector de Massas (Espectrômetro de Massas utilizando ionização por impacto de elétrons - 70eV).

As amostras foram preparadas de acordo com a técnica de injeção sólida desenvolvida por Morgan (1990). As glândulas e asas das operárias de *M. quadrifasciata* foram dissecadas e inseridas, separadamente, em um fino capilar de vidro de fundo cego de aproximadamente 5cm de comprimento. Após a inserção das glândulas ou asas, a outra extremidade do capilar foi selada com fogo. Os capilares foram inseridos no interior do cromatógrafo e quebrados para liberação dos compostos e sua análise. Foi inserida apenas uma glândula ou par de asas por capilar e apenas um capilar introduzido no CG-EM por vez.

As amostras foram conduzidas no modo *splitless*. O protocolo de temperatura utilizado foi de 40°C, mantida por 1 minuto, e aumentada posteriormente até 320°C a uma taxa de 15°C/min., a qual foi mantida por 10 minutos. Foi utilizado Hélio como gás carreador a uma taxa constante de 1.0ml/min.

A quantificação relativa foi realizada com base nas áreas dos picos obtidos nos cromatogramas (SINGER & ESPELIE, 1992). A identificação dos compostos foi realizada através de comparações dos espectros de massa com a biblioteca Wiley e com dados de íons diagnósticos presentes na literatura.

Assim como foi feito para as amostras de *A. mellifera*, foi aplicada análise de correspondência (BENZÉCRI, 1973; GREENACRE, 1984; LANDIM, 2011) aos resultados obtidos, utilizando-se o programa XLSTAT 2010.

3. RESULTADOS

3.1. *Apis mellifera*

3.1.1. Perfil químico da secreção das glândulas salivares cefálicas

A análise química da secreção das GSC de operárias de *A. mellifera* nas diferentes fases da vida revelou um total de 44 compostos, dos quais 31 são hidrocarbonetos, incluindo

alcanos e alcenos cujo número de carbonos nas cadeias variou de C16 a C33, 02 são aldeídos, 01 éster, 01 ácido e 09 compostos não foram identificados. A presença e quantidade dos compostos variaram entre as fases de vida das operárias. Os aldeídos, hexadecanal e octadecanal, são comuns às fases RE, AC e FO, porém o ácido oléico e o éster oleato de etila foram encontrados apenas nas secreções glandulares de operárias AC e FO (Tabela 1).

Foram encontrados 33 compostos químicos na secreção das GSC de RE, sendo os hidrocarbonetos a maioria dos compostos. Destacam-se como mais abundantes o tricosano, heneicosano e Z-tritriaconteno (TR = 26.772). Alguns compostos a mais foram encontrados na secreção glandular de AC, totalizando 42 compostos. Nesta fase da operária, o Z-tritriaconteno (TR = 26.772), o heptacosano e o pentacosano são os 3 compostos mais abundantes. Além disso, os compostos não identificados ND7, ND8 e ND9 apareceram exclusivamente nesta fase da operária. Nas FO foram encontrados 37 compostos e, ao contrário do observado em RE e AC, o composto mais abundante não foi um hidrocarboneto e sim o ácido oléico, seguido pelo heptacosano e pentacosano. O Z-pentacoseno (TR = 19.120) é exclusivo desta fase da operária (Tabela 1).

Os 12 compostos em azul na Tabela 1 são exclusivos das glândulas, não tendo sido encontrados na superfície cuticular.

3.1.2. Perfil químico da superfície cuticular

A superfície cuticular das operárias de *A. mellifera* é constituída principalmente por hidrocarbonetos mas, no caso das operárias AC e FO foram encontrados dois compostos oxigenados pertencentes ao grupo químico dos aldeídos. No total, 44 compostos foram encontrados, dos quais 36 são hidrocarbonetos cujas cadeias variaram de C14 a C33, incluindo alcanos, alcanos metilados e alcenos, 02 compostos são aldeídos e 06 não foram identificados. Nem todos os compostos estão presentes em todas as fases da vida das operárias e os que são comuns às fases analisadas variaram em quantidade (Tabela 2).

A análise do perfil químico da superfície cuticular de RE revelou 37 compostos, sendo 32 hidrocarbonetos e 05 não identificados. Os 3 compostos mais abundantes, em ordem decrescente de quantidade em ppm, são o heptacosano, Z-tritriaconteno (TR = 26.644) e o tetradecano. Foram encontrados 40 compostos na superfície cuticular de AC, sendo 34 hidrocarbonetos, 01 aldeído (octadecanal) e os mesmos 05 não identificados presentes em RE. Os compostos mais abundantes nesta fase são os mesmos encontrados em RE, porém não na mesma ordem. O Z-tritriaconteno (TR = 26.644) é o principal dos compostos, seguido por

tetradecano e heptacosano. Observou-se que o Z-hentriaconteno (TR = 24.937) é exclusivo nesta fase da vida da operária. A análise química da superfície cuticular das FO, revelou a presença de 41 compostos, dos quais 34 são hidrocarbonetos, 02 aldeídos (hexadecanal e octadecanal) e 05 não foram identificados, porém não os mesmos 05 encontrados em RE e AC. O heptacosano é o mais abundante, seguido por pentacosano e Z-tritriaconteno (TR = 26.644). O hexadecanal, Z-heptacoseno (TR = 21.063) e *ND10* são exclusivos desta fase da vida. Como se pode observar, o heptacosano e o Z-tritriaconteno (TR = 26.644) aparecem entre os 3 mais abundantes nas três fases das operárias (Tabela 2).

Os 12 compostos em azul na Tabela 2 são exclusivos da superfície cuticular, não tendo sido encontrados nas glândulas.

3.1.3. Correlação entre os compostos glandulares e de superfície

Uma tabela de correlação (Tabela 3) contendo os compostos encontrados tanto na secreção glandular das operárias quanto na superfície cuticular foi montada. Todos os compostos químicos encontrados foram listados de acordo com o grupo funcional químico a que pertencem ou ao grupo dos compostos não identificados, e numerados (ID = identificação do composto) em ordem crescente nessa Tabela 3.

Observando as Tabelas 1 e 2 é possível notar que grande parte dos compostos encontrados na secreção glandular aparece também na constituição da superfície cuticular. Nota-se que a quantidade relativa dos compostos comuns às glândulas e cutículas pode variar. Deste modo, a Tabela 3 foi montada para melhor visualização da correlação entre os compostos e como as quantias dos mesmos variaram na secreção das GSC e na superfície cuticular das operárias em cada uma das fases estudadas.

Na análise de correspondência (Figura 1), os compostos estão representados por suas respectivas IDs listadas na Tabela 3 e os grupos separados de acordo com a fase analisada (RE, AC e FO) e material analisado (Gla = glândula; Cut = superfície cuticular). A análise estatística de correspondência mostra, na Figura 1, que os compostos que são comuns às glândulas e superfície cuticular das fases analisadas encontram-se no centro do gráfico. Além disso, outras informações podem ser retiradas do gráfico. O fator F1, linha horizontal, separa os grupos GlaAC e GlaFO do grupo GlaRE, indicando que a secreção das glândulas de AC e FO (GlaAC e GlaFO, respectivamente) apresentam conteúdo mais semelhantes entre si do que em relação à secreção glandular de RE (GlaRE). Em relação à composição da superfície cuticular, entretanto, RE e AC estão mais próximos quimicamente, segundo o fator F1. O

fator F2, linha vertical, separa os compostos glandulares dos de superfície cuticular, já que do lado direito da linha há apenas os grupos referentes às análises glandulares, enquanto na parte esquerda do gráfico, os compostos estão voltados para as amostras cuticulares.

Tabela 1. Média e desvio padrão (DP) da quantidade em partes por milhão (ppm) dos compostos encontrados na secreção das glândulas salivares cefálicas de operárias de *Apis mellifera*. Compostos em azul são encontrados exclusivamente na secreção glandular. Compostos mais abundantes em negrito. TR = tempo de retenção; RE = recém emergidas; AC = trabalhando na área de cria; FO = forrageiras.

TR	Composto	RE (n=12) Média ± DP	AC (n=11) Média ± DP	FO (n=14) Média ± DP
Ácido				
14.967	Ácido oléico	-	0.47 ± 0.52	10.05 ± 1.83
Aldeídos				
13.433	Hexadecanal	0.45 ± 0.34	0.46 ± 0.19	1.16 ± 0.56
16.028	Octadecanal	0.74 ± 0.65	0.78 ± 0.55	2.19 ± 1.42
Éster				
15.442	Oleato de etila	-	0.22 ± 0.09	0.96 ± 2.88
Hidrocarbonetos				
7.500	Hexadecano (C16)	0.67 ± 0.83	<i>t</i>	-
8.934	Heptadecano (C17)	-	1.09 ± 0.50	0.24 ± 0.17
10.270	Z-Octadeceno	0.21 ± 0.07	0.29 ± 0.07	0.37 ± 0.33
10.361	Octadecano (C18)	0.70 ± 0.15	0.94 ± 0.37	0.31 ± 0.09
11.762	Nonadecano (C19)	1.59 ± 1.05	0.56 ± 0.27	0.20 ± 0.09
13.041	Z-Eicoseno	0.29 ± 0.15	0.57 ± 0.31	1.06 ± 0.91
13.116	Eicosano (C20)	0.54 ± 0.17	0.59 ± 0.32	0.45 ± 0.26
14.246	Z-Heneicoseno	0.64 ± 0.37	0.97 ± 0.84	1.93 ± 1.34
14.424	Heneicosano (C21)	9.31 ± 6.06	0.48 ± 0.23	0.37 ± 0.21
15.618	Z-Docoseno	-	0.20 ± 0.06	0.21 ± 0.27
15.681	Docosano (C22)	0.87 ± 0.30	0.55 ± 0.11	0.22 ± 0.23
16.779	Z-Tricoseno	1.59 ± 2.44	1.21 ± 0.74	3.22 ± 2.18
16.892	Tricosano (C23)	13.40 ± 7.04	1.45 ± 0.38	3.94 ± 5.68
18.007	Z-Tetracoseno	-	0.28 ± 0.07	0.44 ± 0.35
18.055	Tetracosano (C24)	0.89 ± 0.22	1.19 ± 0.37	0.30 ± 0.17
18.900	Z-Pentacoseno	1.56 ± 0.96	0.84 ± 0.29	0.42 ± 0.46
19.120	Z-Pentacoseno	-	-	0.42 ± 0.34
19.176	Pentacosano (C25)	3.15 ± 1.76	3.18 ± 1.07	4.44 ± 4.52
20.255	Hexacosano (C26)	1.48 ± 0.55	1.79 ± 0.85	0.72 ± 0.49
21.063	Z-Heptacoseno	0.42 ± 0.15	0.71 ± 0.48	0.60 ± 0.64
21.298	Heptacosano (C27)	3.16 ± 2.02	3.88 ± 1.26	5.77 ± 4.90
22.306	Octacosano (C28)	1.28 ± 0.46	1.66 ± 0.45	0.39 ± 0.18
23.070	Z-Nonacoseno	0.46 ± 0.25	0.67 ± 0.27	0.37 ± 0.31
23.272	Nonacosano (C29)	1.24 ± 0.78	1.61 ± 0.90	1.31 ± 1.10
24.209	Triacotano (C30)	0.84 ± 0.81	0.90 ± 0.68	0.25 ± 0.11
24.922	Z-Hentriaconteno	0.67 ± 0.30	0.97 ± 0.30	-
24.979	Z-Hentriaconteno	0.62 ± 0.27	0.74 ± 0.38	0.49 ± 0.47

25.120	Hentriacontano (C31)	1.80 ± 2.01	1.60 ± 0.73	0.56 ± 0.56
26.772	Z-Tritriaconteno	3.34 ± 1.42	6.36 ± 3.55	0.98 ± 0.99
26.825	Z-Tritriaconteno	0.45 ± 0.14	0.92 ± 0.24	-
26.988	Tritriacontano (C33)	1.57 ± 1.14	0.84 ± 0.36	0.30 ± 0.37
<i>Não identificados</i>				
11.516	ND1	-	0.50 ± 0.59	0.11 ± 0.03
18.668	ND2	0.75 ± 0.38	-	0.38 ± 0.29
18.990	ND3	0.41 ± 0.14	0.27 ± 0.03	1.01 ± 0.95
19.972	ND4	0.34 ± 0.21	0.45 ± 0.27	1.22 ± 1.08
20.499	ND5	-	0.48 ± 0.30	2.03 ± 1.87
26.575	ND6	1.39 ± 0.96	1.89 ± 1.04	-
28.858	ND7	-	0.78 ± 0.42	-
29.102	ND8	-	0.97 ± 0.52	-
29.176	ND9	-	0.82 ± 0.44	-

Tabela 2. Média e desvio padrão (DP) da quantidade em partes por milhão (ppm) dos compostos encontrados na superfície cuticular de operárias de *Apis mellifera*. Compostos em azul são encontrados exclusivamente na superfície cuticular. Compostos mais abundantes em negrito. TR = tempo de retenção; RE = recém emergidas; AC = trabalhando na área de cria; FO = forrageiras.

TR	Composto	RE (n=10) Média ± DP	AC (n=15) Média ± DP	FO (n=15) Média ± DP
<i>Aldeídos</i>				
13.437	Hexadecanal	-	-	2.20 ± 1.18
16.028	Octadecanal	-	0.30 ± 0.15	4.13 ± 2.53
<i>Hidrocarbonetos</i>				
4.767	Tetradecano (C14)	7.22 ± 0.87	7.73 ± 0.52	7.55 ± 2.25
7.732	Hexadecano (C16)	<i>t</i>	0.45 ± 0.33	<i>t</i>
10.298	Z-Octadeceno	0.26 ± 0.11	0.38 ± 0.52	0.52 ± 0.21
10.443	Octadecano (C18)	0.87 ± 0.41	0.80 ± 0.20	1.07 ± 0.37
11.751	Nonadecano (C19)	0.72 ± 0.24	0.58 ± 0.08	0.90 ± 0.29
12.100	11-Metilnonadecano	0.29 ± 0.12	0.32 ± 0.16	0.23 ± 0.07
13.044	Z-Eicoseno	0.30 ± 0.21	0.28 ± 0.07	0.93 ± 0.40
13.046	Eicosano (C20)	0.52 ± 0.24	0.63 ± 0.37	1.11 ± 0.65
14.245	Z-Heneicoseno	0.96 ± 0.73	0.86 ± 0.60	1.61 ± 1.37
14.409	Heneicosano (C21)	1.05 ± 0.17	0.34 ± 0.20	0.48 ± 0.30
15.668	Docosano (C22)	0.44 ± 0.20	0.53 ± 0.15	0.46 ± 0.26
16.582	Z-Tricoseno	-	0.50 ± 0.26	2.51 ± 1.94
16.779	Z-Tricoceno	1.28 ± 1.58	0.45 ± 0.52	3.56 ± 2.95
16.882	Tricosano (C23)	6.17 ± 3.00	1.20 ± 0.29	7.28 ± 2.92
18.042	Tetracosano (C24)	0.87 ± 0.48	1.07 ± 0.36	1.01 ± 0.65
18.900	Z-Pentacoseno	0.18 ± 0.05	-	3.68 ± 1.85
19.120	Z-Pentacoseno	0.27 ± 0.10	0.20 ± 0.08	1.12 ± 0.74
19.165	Pentacosano (C25)	4.43 ± 0.53	3.19 ± 0.88	13.40 ± 4.37
19.540	7-Metilpentacosano	0.59 ± 0.22	0.22 ± 0.12	0.48 ± 0.15
20.245	Hexacosano (C26)	1.60 ± 0.84	1.38 ± 1.00	1.79 ± 1.17
21.063	Z-Heptacoseno	-	-	2.51 ± 1.20
21.133	Z-Heptacoseno	0.37 ± 0.47	0.42 ± 0.14	1.15 ± 0.91
21.288	Heptacosano (C27)	13.38 ± 2.38	7.06 ± 1.76	14.70 ± 5.71
21.615	11,13-Metileptacosano	4.91 ± 1.29	1.14 ± 0.32	0.78 ± 0.44
22.290	Octacosano (C28)	1.65 ± 0.78	1.04 ± 0.74	1.28 ± 0.89
23.068	Z-Nonacoseno	0.56 ± 0.21	0.54 ± 0.28	2.36 ± 1.44
23.263	Nonacosano (C29)	6.63 ± 1.97	3.70 ± 1.15	5.01 ± 4.27
23.558	11, 13-Metilnonacosano	6.38 ± 1.81	0.92 ± 0.33	0.50 ± 0.30
24.477	Triacotano (C30)	0.53 ± 0.29	0.51 ± 0.23	0.64 ± 0.15
24.922	Z-Hentriaconteno	-	1.35 ± 0.44	-
24.978	Z-Hentriaconteno	1.39 ± 0.37	2.19 ± 0.87	1.19 ± 0.81

25.110	Hentriacontano (C31)	5.05 ± 2.28	4.97 ± 1.08	3.48 ± 1.83
25.377	7-Metilentriacontano	2.85 ± 0.96	0.57 ± 0.28	-
26.644	Z-Tritriaconteno	12.01 ± 2.85	17.15 ± 5.90	9.04 ± 5.81
26.770	Z-Tritriaconteno	1.90 ± 0.48	5.51 ± 5.77	3.53 ± 2.93
26.979	Tritriacontano (C33)	0.97 ± 0.50	1.42 ± 0.79	0.65 ± 0.36
<i>Não identificados</i>				
26.575	ND6	1.82 ± 0.77	2.55 ± 1.23	2.31 ± 1.13
29.102	ND8	1.11 ± 0.45	1.74 ± 0.93	1.14 ± 0.52
29.176	ND9	1.64 ± 0.60	2.74 ± 1.28	1.30 ± 0.68
16.475	ND10	-	-	4.97 ± 0.94
28.869	ND11	0.60 ± 0.28	0.84 ± 0.43	0.84 ± 0.46
28.935	ND12	0.25 ± 0.13	0.60 ± 0.30	-

Tabela 3. Correlação dos compostos encontrados na secreção da glândula salivar cefálica (GSC) e superfície cuticular (Cut.) de operárias de *Apis mellifera*. ID = identificação do composto; TR = tempo de retenção; RE = recém emergidas; AC = trabalhando na área de cria; FO = forrageiras. *t* = traço. Ausência (-); Presença (+ = *t* a 2,99ppm; ++ = 3,00 a 8,99ppm; +++ = 9,00 a 12,99ppm; ++++ = 13,00 a 18,00ppm).

ID	Composto	RE		AC		FO	
		GSC	Cut.	GSC	Cut.	GSC	Cut.
<i>Ácido</i>							
AC1	Ácido oléico	-	-	+	-	+++	-
<i>Aldeídos</i>							
AL2	Hexadecanal	+	-	+	-	+	+
AL3	Octadecanal	+	-	+	+	+	++
<i>Éster</i>							
E4	Oleato de etila	-	-	+	-	+	-
<i>Hidrocarbonetos</i>							
H5	Tetradecano (C14)	-	++	-	++	-	++
H6	Hexadecano (C16)	+	+	+	+	-	+
H7	Heptadecano (C17)	-	-	+	-	+	-
H8	Z-Octadeceno	+	+	+	+	+	+
H9	Octadecano (C18)	+	+	+	+	+	+
H10	Nonadecano (C19)	+	+	+	+	+	+
H11	11-Metilnonadecano	-	+	-	+	-	+
H12	Z-Eicoseno	+	+	+	+	+	+
H13	Eicosano (C20)	+	+	+	+	+	+
H14	Z-Heneicoseno	+	+	+	+	+	+
H15	Heneicosano (C21)	+++	+	+	+	+	+
H16	Z-Docoseno	-	-	+	-	+	-
H17	Docosano (C22)	+	+	+	+	+	+
H18	Z-Tricoseno	-	-	-	+	-	+
H19	Z-Tricoseno	+	+	+	+	++	++
H20	Tricosano (C23)	++++	++	+	+	++	++
H21	Z-Tetracoseno	-	-	+	-	+	-
H22	Tetracosano (C24)	+	+	+	+	+	+
H23	Z-Pentacoseno	+	+	+	-	+	++
H24	Z-Pentacoseno	-	+	-	+	+	+
H25	Pentacosano (C25)	++	++	++	++	++	++++
H26	7-Metilpentacosano	-	+	-	+	-	+
H27	Hexacosano (C26)	+	+	+	+	+	+
H28	Z-Heptacoseno	+	-	+	-	+	+
H29	Z-Heptacoseno	-	+	-	+	-	+
H30	Heptacosano (C27)	++	++++	++	++	++	++++
H31	11, 13-Metileptacosano	-	++	-	+	-	+

H32	Octacosano (C28)	+	+	+	+	+	+
H33	Z-Nonacoseno	+	+	+	+	+	+
H34	Nonacosano (C29)	+	++	+	++	+	++
H35	11, 13-Metilnonacosano	-	++	-	+	-	+
H36	Triacotano (C30)	+	+	+	+	+	+
H37	Z-Hentriaconteno	+	-	+	+	-	-
H38	Z-Hentriaconteno	+	+	+	+	+	+
H39	Hentriacontano (C31)	+	++	+	++	+	++
H40	7-Metilentriacontano	-	+	-	+	-	-
H41	Z-Tritriaconteno	-	++	-	+++	-	++
H42	Z-Tritriaconteno	++	+	++	++	+	++
H43	Z-Tritriaconteno	+	-	+	-	-	-
H44	Tritriacontano (C33)	+	+	+	+	+	+
<i>Não identificados</i>							
N45	<i>ND1</i>	-	-	+	-	+	-
N46	<i>ND2</i>	+	-	-	-	+	-
N47	<i>ND3</i>	+	-	+	-	+	-
N48	<i>ND4</i>	+	-	+	-	+	-
N49	<i>ND5</i>	-	-	+	-	+	-
N50	<i>ND6</i>	+	+	+	+	-	+
N51	<i>ND7</i>	-	-	+	-	-	-
N52	<i>ND8</i>	-	+	+	+	-	+
N53	<i>ND9</i>	-	+	+	+	-	+
N54	<i>ND10</i>	-	-	-	-	-	+
N55	<i>ND11</i>	-	+	-	+	-	+
N56	<i>ND12</i>	-	+	-	+	-	-

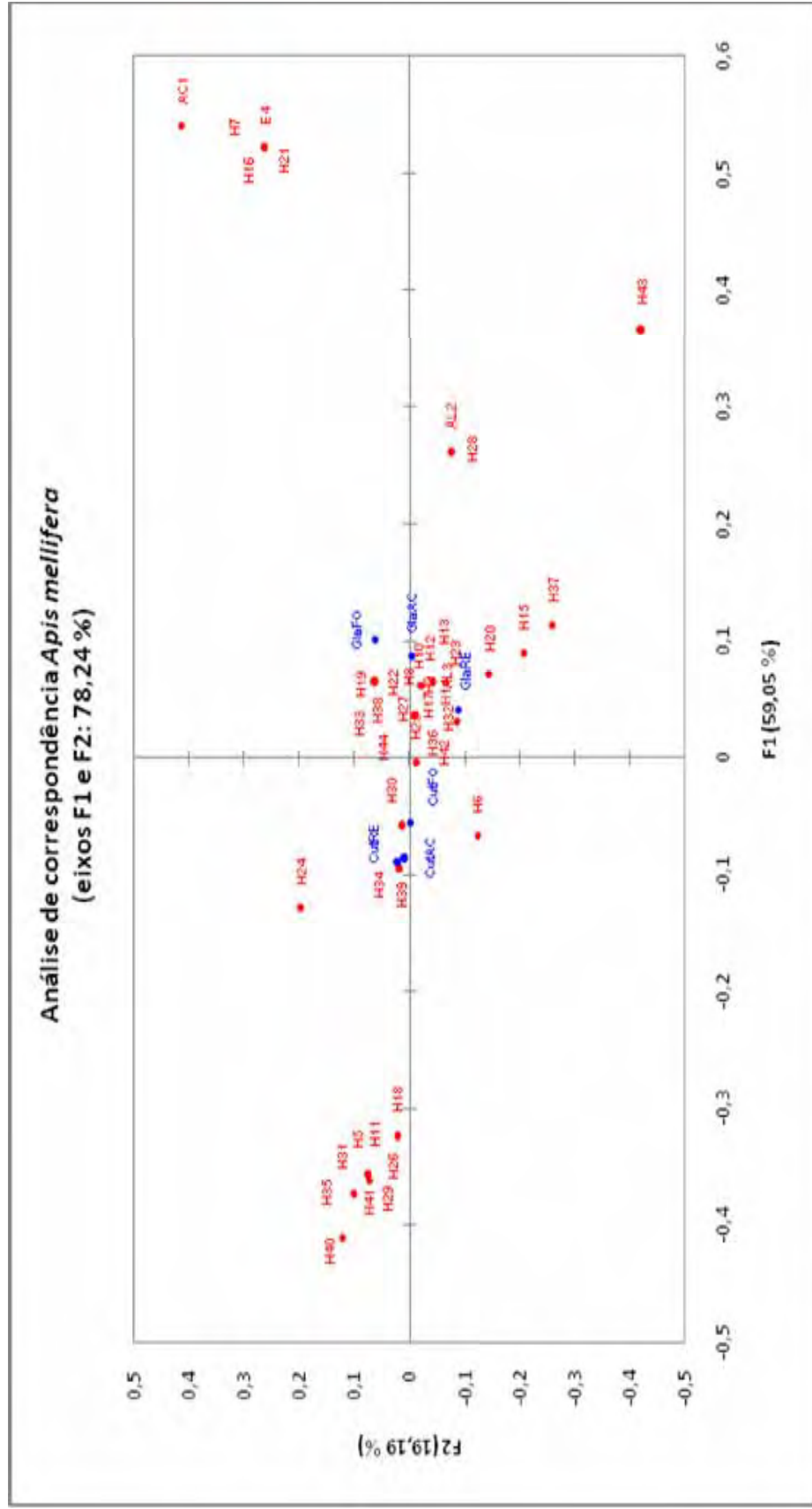


Figura 1. Representação gráfica da análise de correspondência dos compostos cuticulares e da secreção das glândulas salivares cefálicas de operárias de *Apis mellifera*. Os compostos aparecem denominados por suas identificações (IDs) listados na Tabela 3. Notar que os compostos ao centro do gráfico estão presentes tanto na secreção glandular quanto da superfície cuticular. Os hidrocarbonetos do lado esquerdo de F2 são exclusivos da cutícula enquanto os compostos do lado direito da F2 pertencem exclusivamente às glândulas. GlaRE = glândula de operária recém emergida; CutRE = cutícula de operária recém emergida; GlaAC = glândula de operárias trabalhando na área de cria; CutAC = cutícula de operária trabalhando na área de cria; GlaFO = glândula de operária forrageira; CutFO = cutícula de operária forrageira.

3.2. *Melipona quadrifasciata*

3.2.1. Perfil químico da secreção das glândulas salivares cefálicas

As GSC de operárias de *M. quadrifasciata* apresentam-se mais túrgidas de conforme o indivíduo amadurece e passa das atividades intra-coloniais para extra-coloniais mostrando acúmulo de secreção. Foi encontrado um total de 50 compostos, cuja presença e quantidade variaram entre as fases analisadas. Dentre os 50 compostos glandulares, 28 são hidrocarbonetos com cadeias variando de C15 a C31, abrangendo alcanos, alcanos ramificados e alcenos. Além dos hidrocarbonetos foram encontrados compostos oxigenados sendo 01 ácido, 01 cetona e 13 ésteres. Nota-se, portanto, que os ésteres são o segundo grupo de compostos químicos mais abundantes (Tabela 4).

Na secreção glandular de RE foram encontrados 28 compostos, dos quais 4 são ésteres, 18 hidrocarbonetos e 06 não foram identificados. Os três principais compostos são, respectivamente, os alcenos Z-heptacoseno, Z-pentacoseno e Z-nonacoseno. As operárias RE contêm em suas GSC compostos exclusivos, sendo 06 não identificados juntamente com o éster dodecanoato de hexadecila e hidrocarbonetos ZZ-nonacosadieno, 11,13-metilnonacosano e 9,11,13-metilentriacontano (Tabela 4). A secreção glandular de AC é constituída por 32 compostos, sendo 11 ésteres e 21 hidrocarbonetos, enquanto FO apresentou um total de 34 compostos, sendo 01 ácido, 01 cetona, 11 ésteres, 20 hidrocarbonetos e 01 não identificado (Tabela 4).

Operárias AC e FO apresentam o Z-pentacoseno como mais abundante, seguido por Z-heptacoseno. O terceiro composto mais abundante nestas últimas duas fases mencionadas foi o 3-Metilpentacosano para AC e Z-Nonacoseno para FO (Tabela 4).

Assim como observado em RE, as operárias AC contêm exclusivamente os compostos glandulares: tetracosano, 3-metiltetracosano e 11-metilhexacosano, enquanto as FO contêm em suas glândulas compostos que não foram encontrados nas demais fases analisadas, como o ácido decanóico, 2-nonadecanona, acetato de tetradecan-1-ila, pentadecano, heneicosano, 12-metilheneicosano e *NDI* (Tabela 4).

Os compostos em azul na Tabela 4 foram encontrados exclusivamente nas glândulas, não tendo sido verificados na superfície cuticular.

3.2.2. Perfil químico da superfície cuticular

O perfil químico cuticular de operárias de *M. quadrifasciata* mostrou-se bastante similar ao seu conteúdo glandular, apresentando basicamente hidrocarbonetos em sua constituição. Dentre os 35 compostos encontrados, 29 são hidrocarbonetos, 02 são ácidos, 01 éster e 03 não foram identificados. Os hidrocarbonetos variam de C21 a C33, incluindo alcanos, alcenos e muitos alcanos ramificados com grupos metila (Tabela 5).

De um modo geral, os principais compostos cuticulares são os mesmos em todas as fases da vida, porém diferem quantitativamente. Observa-se que os alcenos são os mais abundantes. Foram encontrados 23 compostos constituindo a superfície cuticular de RE, sendo o Z-pentacoseno e Z-heptacoseno os constituintes principais. Já no grupo AC, 28 compostos foram encontrados enquanto em FO foram verificados 22 constituintes químicos. Ao contrário de RE, operárias AC e FO apresentam o Z-heptacoseno como compostos mais abundante seguido do Z-pentacoseno. Os alcanos pentacosano, em RE e AC, e o heptacosano, em FO, aparecem como terceiros compostos mais abundantes (Tabela 5).

A superfície cuticular das operárias RE e AC contém compostos exclusivos dessas fases da vida. O alcano linear heneicosano e alcanos metilados 11,13-metilheptacosano, 5-metilheptacosano, 11,13,15-metilnonacosano, 5-metilnonacosano, 11,13,15-metilhentriacontano são exclusivos de operárias RE. Já em AC, estão presentes octacosano, 3-metilhentriacontano, tritriacontano e os 03 compostos não identificados *ND8*, *ND9*, *ND10*. O único composto encontrado exclusivamente em FO foi o 9,12(ZZ)-ácido octadecadienóico, o qual eluiu juntamente com outro composto não identificado.

Os compostos indicados em azul na Tabela 5 são exclusivos da superfície cuticular.

3.2.3. Correlação entre os compostos glandulares e de superfície

Assim como feito para *A. mellifera*, uma tabela de correlação (Tabela 6) foi montada contendo os compostos encontrados tanto na secreção glandular das operárias quanto na superfície cuticular. Todos os compostos químicos encontrados foram listados de acordo com o grupo funcional químico a que pertencem ou ao grupo dos compostos não identificados, e numerados (ID = número de identificação do composto) em ordem crescente nessa Tabela 6.

Na análise de correspondência (Figura 2), os compostos estão representados por suas respectivas IDs listadas na Tabela 6 e os grupos separados de acordo com a fase analisada (RE, AC e FO) e material analisado (Gla = glândula; Cut = superfície cuticular). Os compostos indicados no centro do gráfico (Figura 2) são comuns às glândulas e superfície cuticular das fases de operárias estudadas. Além disso, o fator F1 (linha horizontal) separou os

grupos AC e FO na parte superior do gráfico, indicando que tanto a constituição química glandular quanto de superfície cuticular são mais semelhantes entre essas duas fases da operária do que em relação à RE, a qual aparece na parte inferior da linha F1. Ainda, o fator F2 (linha vertical) separou os compostos glandulares à direita do gráfico, indicando correlação positiva entre os grupos analisados GlaRE, GlaAC e GlaFO. O mesmo pode ser concluído em relação aos compostos de superfície, os quais estão à esquerda da linha F2, indicando correspondência positiva entre os compostos, nas diferentes fases da vida. Os hidrocarbonetos que aparecem no quadrante superior esquerdo do gráfico da Figura 2 indicam os compostos exclusivos da superfície cuticular das operárias enquanto o grupo de compostos no quadrante superior direito do mesmo gráfico, onde são encontrados principalmente os ésteres, representam os compostos exclusivos das glândulas das operárias, principalmente em relação aos grupos AC e FO que em RE, como mencionado, fases mais próximas quimicamente.

Tabela 4. Média e desvio padrão (DP) da concentração relativa (%) dos compostos químicos encontrados na secreção das glândulas salivares cefálicas de operárias recém emergidas (RE), trabalhando na área de cria (AC) e de forrageiras (FO) de *Melipona quadrifasciata*. Compostos em azul são encontrados exclusivamente na secreção glandular. Compostos mais abundantes em negrito. Os compostos que apresentaram concentração relativa abaixo de 0.05% foram tratados como traços (*t*). TR = tempo de retenção.

TR	Composto	RE (n=10) Média ± DP	AC (n=10) Média ± DP	FO (n=10) Média ± DP
	<i>Ácido</i>			
11.12	Ácido decanóico	-	-	0.09 ± 0.26
	<i>Cetona</i>			
16.13	2-Nonadecanona	-	-	<i>t</i>
	<i>Ésteres</i>			
14.25	Acetato de tetradecan-1-ila	-	-	<i>t</i>
15.29	Acetato de hexadecan-1-ila	-	0.30 ± 0.41	0.16 ± 0.20
15.82	X-Octadecenoato de metila	0.38 ± 0.53	0.13 ± 0.11	0.37 ± 0.23
16.17	Oleato de etila	-	0.32 ± 0.94	0.16 ± 0.25
16.19	Decanoato de decila	-	<i>t</i>	0.06 ± 0.09
16.27	(E)-Acetato de octadecen-1-ila	-	0.18 ± 0.25	0.19 ± 0.18
16.40	Acetato de octadecila	-	0.23 ± 0.32	0.33 ± 0.31
18.70	*Decanoato de octadecila	0.24 ± 0.69	0.20 ± 0.24	-
20.13	Dodecanoato de octadecila	1.81 ± 2.00	0.21 ± 0.25	0.47 ± 0.48
19.89	*Dodecanoato de hexadecila	2.48 ± 2.22	-	-
20.84	Decanoato de eicosila	-	<i>t</i>	0.51 ± 0.71
22.10	Decanoato de docosila	-	0.07 ± 0.11	0.66 ± 1.28
22.60	Decanoato de tetracosila	-	0.15 ± 0.15	1.37 ± 3.06
	<i>Hidrocarbonetos</i>			
12.00	Pentadecano (C15)	-	-	<i>t</i>
13.07	Z-Heptadeceno	-	-	0.12 ± 0.18
15.53	Z-Heneicoseno	-	0.16 ± 0.20	0.12 ± 0.10
15.67	Heneicosano (C21)	-	-	<i>t</i>
15.73	12-Metilheneicosano	-	-	<i>t</i>
16.65	Z-Tricoseno	0.08 ± 0.15	2.32 ± 1.37	2.62 ± 1.53
16.76	Tricosano (C23)	2.46 ± 1.15	1.29 ± 0.74	0.94 ± 0.50
16.94	9-Metiltricosano	-	0.12 ± 0.09	0.22 ± 0.06
17.30	3-Metiltricosano	0.12 ± 0.21	3.03 ± 1.46	3.20 ± 1.67
17.32	Tetracosano (C24)	-	<i>t</i>	-
17.59	11-Metiltetracosano	-	0.46 ± 0.54	0.27 ± 0.41
17.61	3-Metiltetracosano	-	0.49 ± 0.53	-
18.06	Z-Pentacoseno	19.33 ± 7.99	40.73 ± 2.99	38.77 ± 7.48
18.37	Pentacosano (C25)	4.99 ± 1.80	4.72 ± 3.43	4.22 ± 1.51

18.41	9-Metilpentacosano	1.45 ± 0.59	1.23 ± 0.43	1.24 ± 1.04
17.58	5-Metilpentacosano	2.41 ± 0.92	1.16 ± 0.57	-
18.56	3-Metilpentacosano	2.07 ± 0.56	5.29 ± 1.05	5.53 ± 1.53
17.79	11-Metilhexacosano	-	0.54 ± 0.50	-
18.17	Z-Heptacoseno	30.73 ± 5.95	27.85 ± 4.28	26.95 ± 5.56
18.22	Heptacosano (C27)	3.04 ± 1.15	1.07 ± 2.30	-
18.44	11,13-Metilheptacosano	2.86 ± 0.38	1.32 ± 0.57	2.07 ± 1.08
18.60	3-Metilheptacosano	3.59 ± 1.29	1.25 ± 0.62	0.92 ± 0.36
18.72	ZZ-Nonacosadieno	0.47 ± 0.63	-	-
19.72	Z-Nonacoseno	14.51 ± 7.47	4.85 ± 2.25	7.37 ± 3.84
19.91	11, 13-Metilnonacosano	2.39 ± 1.21	-	--
19.93	5-Metilnonacosano	0.48 ± 0.83	0.16 ± 0.17	0.28 ± 0.16
20.45	Z-Hentriaconteno	0.23 ± 0.50	0.12 ± 0.15	0.41 ± 0.52
19.59	9,11,13-Metilhentriacontano	0.34 ± 0.57	-	-
<i>Não identificados</i>				
17.63	<i>ND1</i>	-	-	0.50 ± 0.37
19.39	<i>ND2</i>	0.63 ± 0.70	-	-
19.70	<i>ND3</i>	0.30 ± 0.39	-	-
20.21	<i>ND4</i>	0.12 ± 0.22	-	-
20.58	<i>ND5</i>	0.47 ± 0.82	-	-
20.68	<i>ND6</i>	1.15 ± 1.58	-	-
21.68	<i>ND7</i>	0.26 ± 0.52	-	-

* Outro composto não identificado eluindo junto

Tabela 5. Média e desvio padrão (DP) da concentração relativa (%) dos compostos químicos encontrados na superfície cuticular de operárias recém emergidas (RE), trabalhando na área de cria (AC) e de forrageiras (FO) de *Melipona quadrifasciata*. Compostos em azul são encontrados exclusivamente na superfície cuticular. Compostos mais abundantes em negrito. Os compostos que apresentaram concentração relativa abaixo de 0.05% foram tratados como traços (*t*). TR = tempo de retenção.

TR	Composto	RE (n=10) Média ± DP	AC (n=10) Média ± DP	FO (n=10) Média ± DP
	<i>Ácido</i>			
13.60	Ácido hexadecanóico	0.47 ± 1.02	0.95 ± 1.02	0.44 ± 1.21
14.94	*9,12(ZZ)- Ácido octadecadienóico	-	-	0.06 ± 0.13
	<i>Éster</i>			
14.79	9,12-Octadecadienoato de etila	3.82 ± 7.11	1.75 ± 1.53	0.21 ± 0.57
	<i>Hidrocarbonetos</i>			
14.04	Heneicosano (C21)	1.02 ± 1.14	-	-
15.11	Z-Tricoseno	0.41 ± 0.38	0.19 ± 0.14	<i>t</i>
15.40	Tricosano (C23)	9.28 ± 2.92	1.21 ± 0.62	0.60 ± 0.64
15.75	Mistura de 3-Metiltricosano e Z-Tetracosene	0.38 ± 0.32	0.52 ± 0.22	0.31 ± 0.29
15.80	Tetracosano (C24)	0.48 ± 0.36	0.51 ± 0.28	0.25 ± 0.21
16.34	Z-Pentacoseno	21.27 ± 4.60	19.85 ± 2.62	18.53 ± 5.20
16.49	Pentacosano (C25)	12.58 ± 4.20	16.34 ± 2.29	15.59 ± 5.38
16.51	9,11,13-Metilpentacosano	1.80 ± 0.42	0.44 ± 0.22	0.29 ± 0.23
16.58	5-Metilpentacosano	1.89 ± 1.05	0.53 ± 0.26	0.82 ± 0.30
16.71	Mistura de 3-Metilpentacosano e Z-Hexacosene	2.26 ± 0.88	1.89 ± 0.46	1.82 ± 0.54
16.97	Hexacosano(C26)	0.16 ± 0.26	1.08 ± 0.38	0.81 ± 0.31
17.37	Z-Heptacoseno	18.84 ± 3.59	21.17 ± 3.43	24.78 ± 6.14
17.50	Heptacosano (C27)	4.02 ± 1.21	14.01 ± 1.52	17.68 ± 4.66
17.55	11,13-Metilheptacosano	1.74 ± 0.65	-	-
17.72	7,9-Metilheptacosano	-	0.92 ± 0.26	1.23 ± 0.44
17.78	5-Metilheptacosano	2.90 ± 1.27	-	-
17.85	Z-Octacoseno	-	1.12 ± 0.18	1.23 ± 0.29
17.97	Octacosano (C28)	-	0.06 ± 0.14	-
18.29	Z-Nonacoseno	10.92 ± 3.59	6.92 ± 1.40	8.45 ± 2.45
18.40	Nonacosano (C29)	1.45 ± 1.42	4.73 ± 1.00	5.74 ± 3.10
18.50	11,13,15-Metilnonacosano	1.25 ± 0.56	-	-
18.64	5-Metilnonacosano	0.39 ± 0.41	-	-
18.81	Triacotano (C30)	-	<i>t</i>	-
18.82	11,13,15-Metiltriacontano	-	0.07 ± 0.13	0.06 ± 0.10
19.15	Z-Hentriaconteno	0.79 ± 0.55	0.39 ± 0.25	0.39 ± 0.30
19.23	Hentriacontano (C31)	-	1.18 ± 0.97	0.60 ± 0.60
19.24	11,13,15-Metilhentriacontano	0.54 ± 0.49	-	-
19.86	3-Metilhentriacontano	-	0.44 ± 0.27	-

20.08	<i>Tritriacontano (C33)</i>	-	0.08 ± 0.16	-
<i>Não identificados</i>				
20.77	<i>ND8</i>	-	1.22 ± 0.74	-
21.91	<i>ND9</i>	-	1.48 ± 0.91	-
23.43	<i>ND10</i>	-	0.98 ± 0.49	-

* Outro composto não identificado eluindo junto.

Tabela 6. Correlação dos compostos encontrados na secreção da glândula salivar cefálica (GSC) e superfície cuticular (Cut.) de operárias de *Melipona quadrifasciata*. ID = identificação do composto; TR = tempo de retenção; RE = recém emergidas; AC = trabalhando na área de cria; FO = forrageiras. Ausência (-); Presença (+ = *t* a 5,99%; ++ = 6,00% a 15,99%; +++ = 16,00% a 29,99 %; ++++ = 30,00% a 41,00%).

ID	Composto	RE		AC		FO	
		GSC	Cut.	GSC	Cut.	GSC	Cut.
<i>Ácidos</i>							
A1	Ácido decanóico	-	-	-	-	+	-
A2	Ácido hexadecanóico	-	+	-	+	-	+
A3	*9,12(ZZ) Ácido octadecadienóico	-	+	-	+	-	+
<i>Cetona</i>							
C4	2-Nonadecanona	-	-	-	-	+	-
<i>Ésteres</i>							
E5	9,12- Octadecadienoato de etila	-	++	-	+	-	+
E6	Acetato de tetradecan-1-ila	-	-	-	-	+	-
E7	Acetato de hexadecan-1-ila	-	-	+	-	+	-
E8	X-Octadecenoato de metila	+	-	+	-	+	-
E9	Oleato de etila	-	-	+	-	+	-
E10	Decanoato de decila	-	-	+	-	+	-
E11	(E)-Acetato de octadecen-1-ila	-	-	+	-	+	-
E12	Acetato de octadecila	-	-	+	-	+	-
E13	*Decanoato de octadecila	+	-	+	-	-	-
E14	Dodecanoato de octadecila	+	-	+	-	+	-
E15	*Dodecanoato de hexadecil a	+	-	-	-	-	-
E16	Decanoato de eicosila	-	-	+	-	+	-
E17	Decanoato de docosila	-	-	+	-	+	-
E18	Decanoato de tetracosila	-	-	+	-	+	-
<i>Hidrocarbonetos</i>							
H19	Pentadecano (C15)	-	-	-	-	+	-
H20	Z-Heptadeceno	-	-	-	-	+	-
H21	Z-Heneicoseno	-	-	+	-	+	-
H22	Heneicosano (C21)	-	+	-	-	+	-
H23	12-Metilheneicosano	-	-	-	-	+	-
H24	Z-Tricoseno	+	+	+	+	+	+
H25	Tricosano (C23)	+	++	+	+	+	+
H26	9-Metiltricosano	-	-	++	-	++	-
H27	3-Metiltricosano	+	+	+	+	+	+
H28	Tetracosano (C24)	-	+	+	+	-	+
H29	11-Metiltetracosano	-	-	+	-	+	-
H30	3-Metiltetracosano	-	-	+	-	-	-

H31	Z-Pentacoseno	+++	+++	++++	+++	++++	+++
H32	Pentacosano (C25)	++	+++	++	+++	++	+++
H33	9,11,13-Metilpentacosano	-	+	-	+	-	+
H34	9-Metilpentacosano	+	+	+	+	+	+
H35	5-Metilpentacosano	+	+	+	+	-	+
H36	3-Metilpentacosano	+	+	++	+	++	+
H37	Hexacosano (C26)	-	+	-	+	-	+
H38	11-Metilhexacosano	-	-	+	-	-	-
H39	Z-Heptacoseno	+++	+++	+++	+++	+++	+++
H40	Heptacosano (C27)	++	++	+	+++	-	+++
H41	11,13 Metilheptacosano	+	+	+	-	+	-
H42	7,9-Metilheptacosano	-	-	-	+	-	+
H43	5-Metilheptacosano	-	+	-	-	-	-
H44	3-Metilheptacosano	++	-	+	-	+	-
H45	Z-Octacoseno	-	-	-	+	-	+
H46	Octacosano (C28)	-	-	-	+	-	-
H47	ZZ-Nonacosadieno	+	-	-	-	-	-
H48	Z-Nonacoseno	+++	++	++	++	++	++
H49	Nonacosano (C29)	-	+	-	++	-	++
H50	15-Metilnonacosano	-	+	-	-	-	-
H51	11, 13-Metilnonacosano	+	+	-	-	-	-
H52	5 - Metilnonacosano	+	+	+	-	+	-
H53	Triacotano (C30)	-	-	-	+	-	-
H54	11,13,15 Metiltriacotano	-	-	-	+	-	+
H55	Z-Hentriacoteno	+	+	+	+	+	+
H56	9,11,13 Metilhentriacotano	+	+	-	-	-	-
H57	3-Metilhentriacotano	-	-	-	+	-	-
H58	Tritriacotano (C33)	-	-	-	+	-	-
<i>Não identificados</i>							
N59	<i>ND1</i>	-	-	-	-	+	-
N60	<i>ND2</i>	+	-	-	-	-	-
N61	<i>ND3</i>	+	-	-	-	-	-
N62	<i>ND4</i>	+	-	-	-	-	-
N63	<i>ND5</i>	+	-	-	-	-	-
N64	<i>ND6</i>	+	-	-	-	-	-
N65	<i>ND7</i>	+	-	-	-	-	-
N66	<i>ND8</i>	-	-	-	+	-	-
N67	<i>ND9</i>	-	-	-	+	-	-
N68	<i>ND10</i>	-	-	-	+	-	-

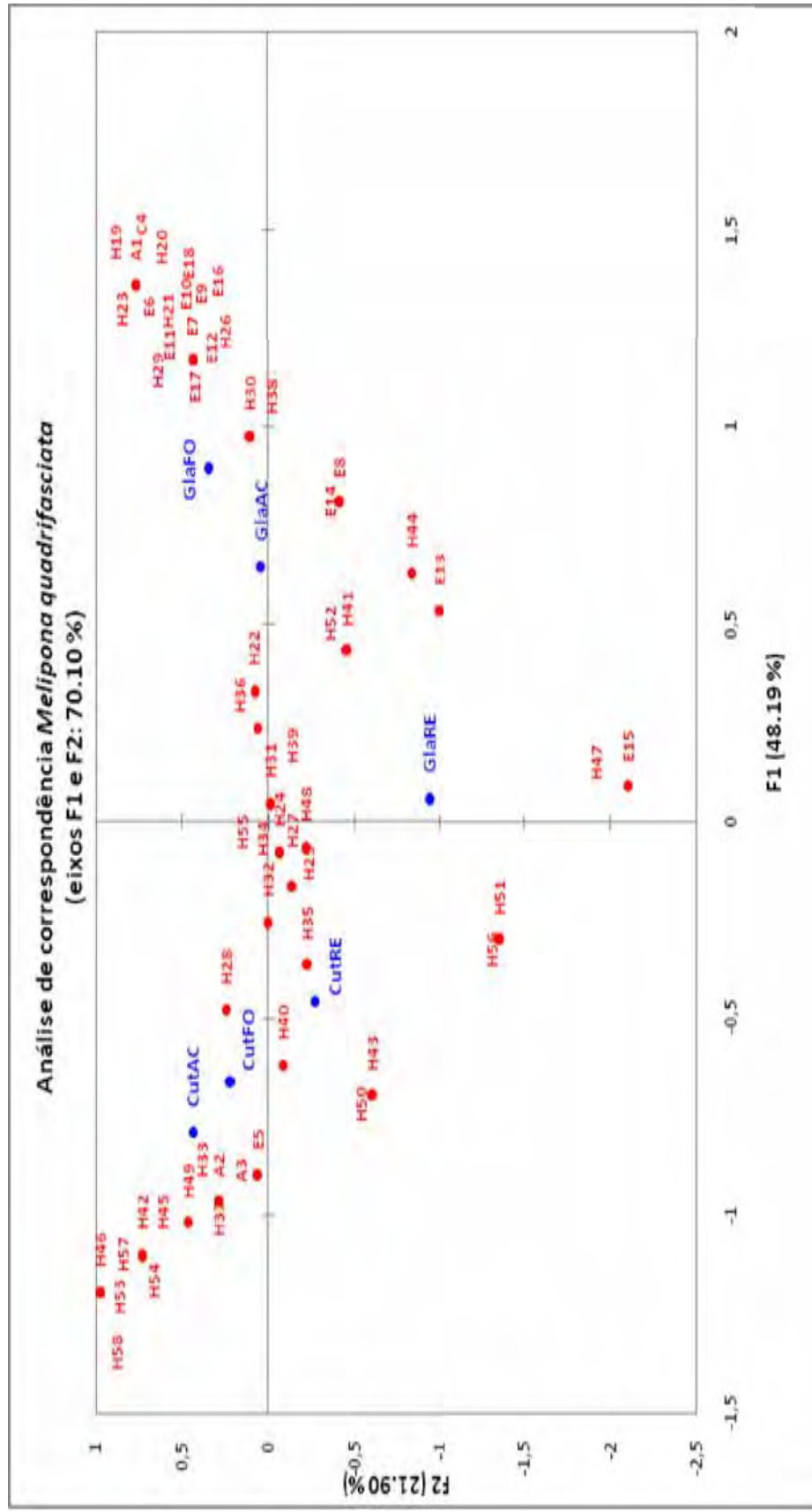


Figura 2. Representação gráfica da análise de correspondência dos compostos cuticulares e da secreção das glândulas salivares cefálicas de operárias de *Melipona quadrifasciata*. Os compostos aparecem denominados por suas identificações (IDs) listados na Tabela VI. Os compostos ao centro do gráfico estão presentes tanto nas secreções glandulares quanto na secreção glandular superior e são também os compostos mais abundantes nesses compartimentos. Os hidrocarbonetos no canto esquerdo superior são exclusivos da cutícula enquanto no lado esquerdo, os compostos representados principalmente pelos ésteres, são exclusivos das glândulas. GlaRE = glândula de operária recém emergida; CutRE = cutícula de operária recém emergida; GlaAC = glândula de operárias trabalhando na área de criação; CutAC = cutícula de operária trabalhando na área de criação; GlaFO = glândula de operária forrageira; CutFO = cutícula de operária forrageira.

4. DISCUSSÃO

Trabalho anterior realizado por Katzav-Gozansky et al. (2001) relacionou um total de 22 compostos na secreção das GSC de operárias de *A. mellifera*, entretanto as análises abrangeram apenas operárias nutridoras (correspondentes às presentes AC) e forrageiras (FO), deixando de lado as operárias mais jovens (RE) e apenas hidrocarbonetos foram encontrados. No presente trabalho, um total de 44 compostos foi encontrado, incluindo-se operárias recém emergidas na análise, acrescentando, portanto, dados relevantes para o conhecimento a respeito do perfil químico da secreção das GSC e de como ocorrem as mudanças no perfil químico ao longo das mudanças de fases e tarefas desempenhadas pelas operárias. Tendo como hipótese a contribuição da secreção desta glândula para a constituição da superfície cuticular, ambos os compartimentos foram analisados nas espécies em estudo. Os resultados permitem sugerir a contribuição da glândula para a formação do perfil químico da superfície cuticular, já que dos 44 compostos encontrados na superfície cuticular, 32 também fazem parte da secreção glandular e a análise de correspondência mostra que estão relacionados. No caso das operárias de *M. quadrifasciata*, menor correspondência foi encontrada. Entretanto, para *M. quadrifasciata*, os compostos mais significativos quantitativamente tanto das GSC quanto na superfície cuticular são os mesmos e aparecem em grandes porcentagens.

É lícito pensar que mesmo que a secreção glandular contribua para a composição do perfil químico dos compostos de superfície, esta não seja sua única função, que além da reposição dos hidrocarbonetos de superfície, alguns destes compostos e outros, principalmente os ésteres, tenham outras funções.

Em ambas as espécies a composição da secreção e dos compostos de superfície mostrou-se diferente de uma fase para a outra da vida não só na quantidade e diversidade dos compostos presentes, como pela apresentação de compostos exclusivos da fase das operárias sugerindo relação com o seu estado fisiológico e/ou com a atividade exercida.

Em geral o grupo RE apresentou menor número de compostos e menor variedade tanto na secreção glandular como na superfície cuticular, enquanto estes aumentaram nas fases de AC e FO sugerindo síntese ou aquisição do ambiente de novas substâncias. O grupo RE, representado pelas operárias recém saídas do favo de cria ainda não se alimentaram das reservas do ninho nem tiveram contato com os seus materiais e companheiras. Por outro lado, entre aquelas que trabalham na área de cria (AC) encontram-se as em fase de transição para a fase de forrageamento (FO). Estas estão em processo de acúmulo de secreção em suas glândulas para ser utilizada quando a operária passa a realizar as tarefas de forrageio (POIANI

& CRUZ-LANDIM 2009, 2010a,b,c), conforme interpretação dada por essas autoras aos resultados obtidos com o estudo da histologia e ultraestrutura dessas glândulas. A análise de correspondência indicou no entanto que, em *A. mellifera* o perfil químico da superfície cuticular é mais semelhante entre RE e AC do que com FO, porém em *M. quadrifasciata* a maior semelhança ocorre entre os grupos AC e FO.

A sugestão dos presentes resultados é que a secreção das GSC nas espécies estudadas possa atuar tanto como feromônio de contato através dos compostos que se incorporam à cutícula como feromônios com ação olfatória através dos compostos mais voláteis. As mesmas glândulas exócrinas nas diferentes espécies de abelhas são capazes de produzir secreções com composições químicas diferentes e desempenhar funções distintas. Esta plasticidade funcional das glândulas também ocorre em relação à GSC das abelhas que as possuem e suportam o papel duplo sugerido.

No que se refere à contribuição para os compostos de superfície, análises químicas da secreção da GSC de *A. mellifera* (ARNOLD & DELAGE-DARCHEN, 1978; ARNOLD et al., 1996) e de *Bombus (Rhodobombus) mesomelas* (TERZO et al., 2005), evidenciaram os mesmos hidrocarbonetos na secreção glandular e na epicutícula que recobre o corpo destas abelhas. A secreção das GSC de machos de *B. mesomelas* corresponde aos hidrocarbonetos cuticulares (KULLENBERG et al., 1973; BERGMAN & BERGSTRÖM, 1997) e foram encontradas similaridades entre os hidrocarbonetos cuticulares e os hidrocarbonetos da secreção da glândula de Dufour em abelhas e vespas (OLDHAM et al., 1994; DANI et al., 1996, 2001). Em formigas, os mesmos hidrocarbonetos foram encontrados na secreção da glândula pós-faríngea e sobre a cutícula (BAGNÈRES & MORGAN, 1991). Meskali et al. (1995), Soroker et al. (1995) e Soroker e Hefetz (2000) demonstraram a transferência da secreção da glândula pós-faríngea para a cutícula e a distribuição da secreção das glândulas entre os diferentes indivíduos do ninho através da trofalaxis. No caso de *A. mellifera*, foi observado (observação pessoal) que após contato com a água, a operária necessita de uma certa “limpeza e recomposição ou reposição” dos compostos de superfície. O comportamento de passar as pernas dianteiras na abertura do aparelho bucal e em seguida como se estivesse espalhando pela cabeça, faz pensar que a operária está espalhando algum tipo de secreção. Entretanto, as pernas dianteiras não alcançam toda a extensão do abdômen e verificou-se o mesmo comportamento de passar as pernas traseiras no abdômen, desde a abertura vaginal, acompanhado por movimentos abdominais, parece repor os compostos cuticulares. A glândula de Dufour em *A. mellifera* contém hidrocarbonetos colônia-específicos (HEFETZ, 1987; KATVAZ-GOZANSKY et al., 2000) e poderia ser responsável pela reposição destes na

superfície cuticular do abdômen enquanto a secreção da GSC poderia ter a mesma função espalhando os compostos na cabeça e parte do tórax.

Mesmo que a secreção passe a integrar os compostos de superfície é esperado que a quantidade relativa dos compostos presentes nos dois compartimentos (glândula e superfície cuticular) em ppm seja diferente como se verificou, já que possíveis perdas podem ocorrer na transferência dos compostos de um compartimento para outro, além do contínuo desgaste sofrido pela superfície corpórea, principalmente nas forrageiras devido às atividades fora da colônia. Deve ser esclarecido que nem sempre o fato de um composto ser encontrado na secreção glandular e nos compostos de superfície, significa que este é de origem endógena. As glândulas exócrinas dos insetos têm também função excretora e Hefetz et al. (1993) mostraram que em *Bombus* os hidrocarbonetos da secreção da glândula de Dufour são adquiridos da alimentação e excretados por essa via. Em geral, a ultraestrutura das GSC suporta que tenham além de papel secretor também o de excretor (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2009; Capítulo 4.1 desta tese).

Os principais hidrocarbonetos encontrados na superfície cuticular das operárias de *A. mellifera* são alcanos, seguidos dos alcenos, enquanto ocorre o contrário em operárias de *M. quadrifasciata*, sendo os alcenos mais abundantes que os alcanos. Contudo, o perfil cuticular difere em ambas as espécies entre as fases da vida das operárias seja na qualidade dos compostos seja na sua quantidade.

Variações nos compostos cuticulares ocorrem entre as espécies, sexos, castas e nestas de acordo com a fase e/ou tarefas que o indivíduo está executando (ABDALLA et al., 2003; NUNES et al. 2008, 2009b). Em meliponíneos Ferreira-Caliman et al. (2010), mostraram que o perfil cuticular de operárias de *Melipona marginata* é formado por alcanos, alcenos e alcadienos os quais variam de acordo com a tarefa do indivíduo na colônia. Já Abdalla et al. (2003), encontraram alcenos como os principais compostos cuticulares em *Melipona bicolor*, os mesmos compostos que são mais freqüentes em *Melipona scutellaris* e *Melipona rufiventris* (PIANARO et al., 2007). Estudos anteriores apontaram, fora do gênero *Melipona*, que os alcanos são os principais constituintes cuticulares em *Scaptotrigona bipunctata* (JUNGNICKEL et al., 2004), e *Frieseomelitta varia* (NUNES et al., 2009a). Os alcanos formam uma camada impermeável, o que dá resistência à dessecação, enquanto os alcenos formam uma camada mais permeável e poderiam estar relacionados à comunicação química (GIBBS, 2002).

Os compostos exclusivos dão especificidade à fase e provavelmente são de origem endógena e determinam o amadurecimento ou a fase da vida na qual a operária está. Após a

emergência da operária adulta, o contato com a cera da colônia, conforme se dá a realização das tarefas, pode influenciar na aquisição de compostos para a superfície cuticular, principalmente nas operárias AC e talvez contribua para a maior variedade de compostos encontrada nesta fase. Como verificado por Breed et al. (2004), no caso de *A. mellifera*, do contato com a cera provém compostos, principalmente ácidos graxos, os quais atuam como sinais de reconhecimento dos companheiros do ninho. O presente trabalho não elucidou a origem dos compostos exclusivos na superfície cuticular de FO, podendo ser de origem endógena ou ainda podem ser de origem exógena, relacionados às atividades de forrageio, já que os odores das fontes de coleta podem ser adquiridos pela cutícula, porém os mesmos não afetam o reconhecimento de companheiros de ninho (BOWDEN et al., 1998).

Quanto à produção pelas glândulas de feromônios olfatórios verificou-se que o grupo FO tanto de *M. quadrifasciata* como de *A. mellifera* contém ésteres na secreção glandular, apesar de em pequena quantidade. Sabe-se que em alguns meliponíneos os ésteres são os compostos das GSC responsáveis pela formação de trilha de cheiro para informar a fonte de alimento às companheiras de ninho. Decanoato de hexil foi o primeiro feromônio de trilha descrito para meliponíneos, no caso para a espécie *Trigona recursa*, o qual encontra-se na secreção das GSC (JARAU et al., 2006). Em seguida, outros ésteres com a mesma função de marcação de trilha de cheiro foram descritos: octanoato de octil e butanoato de farnesil, foram, respectivamente, encontrados nas secreções das GSC de *Trigona spinipes* (SCHORKOPF et al., 2007) e *Geotrigona mombuca* (STANGLER et al., 2009). Recentemente, Jarau et al. (2010) demonstraram que a secreção das GSC de operárias forrageiras de *Trigona corvina* contém um leque de compostos responsáveis pela marcação de trilha de cheiro, formado principalmente por ésteres, além de comprovarem que ocorre variação na quantidade destes ésteres entre as colônias desta espécie. Forte evidência de que os compostos das GSC possam ser usados como feromônio de trilha de cheiro foi verificada para a espécie *Scaptotrigona postica* no Capítulo 4.3 desta tese. Poderia ser, então, que mesmo em pequena quantidade os ésteres das glândulas de operárias FO de *M. quadrifasciata* possam desempenhar função semelhante na comunicação da fonte de alimento para as companheiras de ninho e no grupo AC o aparecimento desses compostos possa estar relacionado a ser esta uma fase de transição das tarefas intra para extra coloniais, mesmo porque, segundo a análise de correspondência, os grupos AC e FO apresentaram maior semelhança nos conteúdos glandulares do que em relação ao grupo RE. Em *A. mellifera*, a quantidade e a variedade dos possíveis feromônios olfatórios na secreção das GSC são menores quando comparadas com o que foi encontrado em *M. quadrifasciata*. Não é de meu conhecimento nenhum estudo feito com *A. mellifera*

com sua secreção glandular visando investigar um possível papel feromonal. Além disso, o fato da espécie comunicar a localização das fontes de alimento por dança a coloca numa posição diferente dos meliponíneos.

Em conclusão, tanto a secreção das GSC como os perfis cuticulares apresentam correspondência química no que se refere à presença de hidrocarbonetos. É possível, então, sugerir que a secreção dessas glândulas contribua para a constituição do perfil químico da superfície cuticular de operárias de *A. mellifera* e *M. quadrifasciata*. Os indivíduos recém emergidos produzem os hidrocarbonetos cuticulares em seus enócitos e provavelmente à medida que envelhecem passam a ter a contribuição das GSC, além de adquirirem alguns compostos a partir do contato com o material do ninho, como comprovado no caso de *A. mellifera* (BREED et al., 2004).

Portanto, não só a composição dos compostos endógenos muda como também a presença de material exógeno contribui para uma maior complexidade da composição do perfil cuticular nas operárias trabalhando no favo. Quando a abelha começa a executar as tarefas de forrageamento, no caso de operárias de *M. quadrifasciata*, observou-se que a quantidade de compostos cuticulares diminui talvez porque ela passa boa parte do tempo fora da colônia e, conseqüentemente, menos tempo em contato com a cera, e o desgaste destes é repostos apenas por compostos de origem endógena através das glândulas. Além da função de caracterizar a fase da vida da operária, os compostos de superfície de origem endógena podem também, nesta fase, servir para identificar o ninho de procedência. Vários trabalhos têm mostrado diferenças na composição dos compostos de superfície e a aceitação dos indivíduos entre diferentes colônias (BREED et al., 1988; DOWNS & RATNIEKS, 1999; D'ETTORRE et al., 2006). Deste modo, é possível que as GSC sejam uma fonte de hidrocarbonetos para manutenção da composição cuticular que herdados caracterizem a colônia de onde provém as operárias. Outros compostos presentes na secreção, que não são transferidos para a cutícula, como os ésteres, podem ter função de feromônios olfatórios.

Assim respondendo à questão proposta no título do capítulo e a hipótese formulada, pode ser dito que hidrocarbonetos provenientes das GSC de *A. mellifera* e *M. quadrifasciata* estão também presentes na superfície cuticular. Pode ainda ser acrescentado que os dados indicam que mesmo que a função destas glândulas seja a de produzir/transferir esses compostos para a superfície do corpo, esta não é a única função e o papel de feromônio olfatório, principalmente para as operárias forrageiras não pode ser descartado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, F.C.; JONES, G.R.; MORGAN, E.D. & CRUZ-LANDIM, C. Comparative study of the cuticular hydrocarbons composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. **Genet. Mol. Res.**, v.2, p.191-199, 2003.
- ARNOLD, G. & DELAGE-DARCHEN, B. Nouvelles données sur l'équipement enzymatique des glandes salivaires de l'ouvrière d' *Apis mellifera* (Hyménoptère, Apide). **Ann. Sc. Nat. Zool.**, 12^a série, v.20, p.401-422, 1978.
- ARNOLD, G.; QUENET, B.; CORNUET, J.M.; MASSON, C.; SCHEPPER, B. DE; ESTOUP, A. & GASQU, P. Kin recognition in honey bees. **Nature**, v.379, p.498, 1996.
- BAGNÈRES, A.G. & MORGAN, E.D. The postpharyngeal glands and the cuticle of *Formicidae* contain the same characteristic hydrocarbons. **Experimentia**, v.47, p.106-111, 1991.
- BENZÉCRI, J.P. **Analyse des Données**. Dunod, Paris, France. 1973.
- BERGMAN, P. & BERGSTRÖM, G. Scent marking, scent origin, and species specificity in male pre-mating behavior of two scandinavian bumblebees. **J. Chem. Ecol.**, v.23, n.5, p.1235-1251, 1997.
- BLOMQUIST, G.J. & DILLWITH, J.W. Cuticular lipids. In: KERKUT, G.A. & GILBERT L. I. (Eds.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. 1st.ed., Pergamon Press, Oxford. 1985, pp.117-154.
- BLOMQUIST, G.J.; TILLMAN, J.A.; MPURU, S. & SEYBOLD, S.J. The cuticle and cuticular hydrocarbons of insects: structure, function and biochemistry. In: VANDER MEER, R.K.; BREED, M.D.; WINSTON, M.L. & ESPELIE, E.K (Eds.). **Pheromone communication in social insects**. Westview, Boulder. 1998, pp.35-54.
- BOWDEN, R.M.; WILLAMSON, S. & BREED, M.D. Floral oils: their effect on nestmate recognition in the honeybee, *Apis mellifera*. **Insectes Sociaux**, v.45, p.209–214, 1998.
- BREED, M.D.; WILLIAMS, K.R. & FEWELL, J.H. Comb wax mediates the acquisition of nest-mate recognition cues in honeybees. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v.85, p.8766-8769, 1988.
- BREED, M.D. & STILLER, T.M. Honey bees, *Apis mellifera*, nestmate discrimination: hydrocarbons effects and the evolutionary implications of comb choice. **Anim. Behav.**, v.43, p.875-883, 1992.
- BREED, M.D.; PEERY, S. & BJOSTAD, L.B. Testing the blank slate hypothesis; why honey bee colonies accept young bees? **Insectes Sociaux**, v.51, p.12-16, 2004.
- CARLIN, N.F. Discrimination between and within colonies of social insects: two null hypotheses. **Netherlands Journal of Zoology**, v.39, p.86-100, 1989.

CHAPMAN, R.F. **The Insects: Structure and Function**. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1998. 770p.

CHINO, H. Lipid transport: biochemistry of hemolymph lipophorin. In: KERKUT, G.A. & GILBERT, L.I. (Eds.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. v.10. Oxford Pergamon Press. 1985, pp.115-135.

CRUZ-LANDIM, C. Polimorfismo na Ocorrência de Glândulas Exócrinas nas Abelhas (Hymenoptera, Apoidea). **Anais do Encontro Sobre Abelhas**, Ribeirão Preto, v.1, p.118-129, 1994.

D'ETTORRE, P.; WENSELLERS, T.; DAWSON, J.; HUTCHINSON, S.; BOSWELL, T. & RATNIEKS, F.L.W. Wax combs mediate nestmate recognition by guard honeybees. **Anim. Behav.**, v.71, p.773-779, 2006.

DANI, F.R.; FRATINI, S. & TURILLAZZI, S. Behavioural evidence for the involvement of Dufour's gland secretion in nestmate recognition in the social wasp *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae). **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v.38, p.311-319, 1996.

DANI, F.R.; JONES, G.R.; DESTRI, S.; SPENCER, S.H. & TURILLAZI, S. Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. **Anim. Behav.**, v.62, p.165-171, 2001.

DIELH, P.A. Paraffin synthesis in the oenocytes of the desert locust. **Nature**, v.243, p.468-470, 1973.

DIEHL, P.A. Synthesis and release of hydrocarbons by the oenocytes of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **J. Insect Physiol.**, v.21, p.1237-1246, 1975.

DOWNS, S.G. & RATNIEKS, F.L.W. Recognition of conspecifics by honeybee guards uses nonheritable cues acquired in the adult stage. **Anim. Behav.**, v.58, p.643-648, 1999.

FERREIRA-CALIMAN, J.M.; NASCIMENTO, F.S.; TURATTI, I.C.; MATEUS, S.; LOPES, N.P. & ZUCCHI, R. The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. **Journal of Insect Physiology**, v.56, p.800-804, 2010.

FREE, J.B. **The social organization of the bumblebee colony**. Fleet, Hants, UK.: The Central Association of Bee-Keepers. 1961.

GAMBOA, G.J. Kin recognition in social wasps. In: TURILLAZZI, S. & WEST-EBERHARD, M.J. (Eds.). **Natural History and Evolution of Paper Wasps**. Oxford University Press, UK, 1996, pp.161-177.

GAMBOA, J.G.; GRUDZIEN, T.A.; ESPELIE, K.E. & BURA, E.A. Kin recognition in social wasps: combining chemical and behavioural evidence. **Anim. Behav.**, v.51, p.625-629, 1996.

GIBBS, A. Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. **J. Insect Physiol.**, v.48, p.391-400, 2002.

GREENACRE, M. **Theory and Applications of Correspondence Analysis**. London, England: Academic Press. 1984

GU, X.; QUILICI, D.; JUAREZ, P.; BLOMQUIST, G.J. & SCHAL, C. Biosynthesis of hydrocarbons and contact sex pheromone and their transport by lipophorin in females of German cockroach (*Blattella germanica*). **J. Insect Physiol.**, v.41, p.257-267, 1995.

GUERINO, A.C. Glândulas tegumentares do abdômemde *Bombinae* e *Euglossinae*: ocorrência e morfologia. **Dissertação de mestrado**. UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. 1999.

HANGARTNER, W.; REICHSON, J.M. & WILSON, E.O. Orientation to nest material by the ant, *Pogonomyrmex badius* (Latreille). **Anim. Behav.**, v.18, p.331-334, 1970.

HEFTZ, A. The role of Dufour's gland secretions in bees. **Physiol. Entomol.**, v.12, p.243-253, 1987.

HEFETZ, A.; FALIS, H.M. & BATRA, S.W.T. Natural polyesters: Dufour gland secretion of halictine bees. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.61B, 129-132, 1979.

HEFTZ, A.; TENGÖ, J.; LÜBKE, G. & FRANCKE, W. Inter-colonial and intra-colonial variation in Dufour's gland secretion in bumble bee species of *Bombus hypinorum* (Hymenoptera: Apidae). In: WEISE, K.; GRIBAKIN, F.G. & RENNINGER, G. (Eds). **Sensory Systems of Arthropods**. Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, p.469-480.

HESELHAUS, F. Die Hautchüsen der Apiden und Verwandter formen. **Zool. Jahrb. Jena Abt. J. Anat.**, v.43, p.363-464, 1922.

HOWARD, R.W. Cuticular hydrocarbons and chemical communication. In: STANLEY-SAMUELSON, D.W. & NELSON, D.R. (Eds.). **Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology**. University of Nebraska Press, Lincoln, 1993, pp.179-226.

HUBBARD, M.D. Influence of the nest material and colony odour on digging in the ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, v.9, p.127-132, 1974.

JARAU, S.; HANCIR, M.; ZUCCHI, R. & BARTH, F.G. A Stingless Bee Uses Labial Gland Secretions for Scent Trail Communication (*Trigona recursa* Smith, 1863). **J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav Physiol.**, v.190, n.3, p.233-239, 2004.

JARAU, S.; SCHULZ, C.M.; HRNCIR, M.; FRANCKE, W.; ZUCCHI, R.; BARTH, F.G. & AYASSE, M. Hexyl decanoate, the first trail pheromone compound identified in a stingless bee, *Trigona recursa*. **J. Chem. Ecol.**, v.32, p.1555-1564, 2006.

JARAU, S.; DAMBACHER, J.; TWELE, R.; AGUILAR, I.; FRANCKE, W. & AYASSE, M. The trail pheromone of a stingless bee, *Trigona corvine* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), varies between population. **Chemical Senses**, v.35, n.7, p.593-601, 2010.

JUNGNICKEL, H.; DA COSTA, A.J.S.; TENTSCHERT, J.; PATRICIO, E.F.L.R.A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; DRIJFHOUT, F.P. & MORGAN, E.D. Chemical basis for

inter-colonial aggression in the stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae). **J. Insect Physiol.**, v.50, p.761-766, 2004.

KATZAV-GOZANSKY, T.; SOROKER, V. & HEFETZ, A. Plasticity in caste-related exocrine secretion biosynthesis in the honey bee (*Apis mellifera*). **J. Insect Physiol.**, v.16, p.993-998, 2000.

KATZAV-GOZANSKY, T.; SOROKER, V.; IONESCU, A.; ROBINSON, G.E. & HEFETZ, A. Task-related chemical of labial gland volatile secretion in worker honeybees (*Apis mellifera ligustica*). **J. Chem. Ecol.**, v.27, n.5, p.919-926, 2001.

KRAMER, S. & WIGGLESWORTH, V.B. The outer layer of the cuticle in the coackroach *Periplaneta americana* and the function of the oenocytes. **Quant. J. Microsc. Sci.**, v.91, p.63-73, 1950.

KULLEMBERG, B.; BERGSTRÖM, G.; BRINGER, B.; CALBERG, B. & CEDERBERGER, B. Observation of scent marking by *Bombus* Latr. and *Psithyrus* Lep. Males (Hym., Apidae) and localization of site of production of the secretion. **Zoom. Suppl.**, v.1, p.23-30, 1973.

LANDIM, P.M.B. **Análise estatística de dados geológicos multivariados**. Ed. Oficina de Textos. 2011. 208p.

LANGE, R. Über die futterweitergabe zwischen angehörigen verschiedener Waldameisenstaaten. **Zeitschrift für Tierpsychologie**, v.17, p.389-401, 1960.

LIANG, D. & SILVERMAN, J. “You are what you eat”: Diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant *Linepithema humile*. **Naturwissenschaften**, v.87, p.412-416, 2000.

LOCKE, M. The structure and formation of the integument in insects. In: ROCKSTEIN, M. (Ed). **The Physiology of Insecta**. v.3. Academic Press, 1964, pp.379-470.

LOCKEY, K.H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.89B, p.595-645, 1988.

LORENZI, M.C; BAGNÈRES, A.G. & CLÉMENT, J-L. The role of cuticular hydrocarbons in social insects: is it the same in paper wasps? In: TURILLAZZI, S. & WEST-EBERHARD, M.J. (Eds.). **Natural History and Evolution of Paper wasps**. Oxford University Press, UK, 1996, pp. 178-189.

MESKALI, M.; BONAVIDA-COUGOURDAN, A.; PROVOST, E.; BAGNÈRES, A.G.; DUSTICIER, G. & CLÉMENT, J.L. Mechanism underlying cuticular hydrocarbons homogeneity in the ant *Camponotus vagus* Scop. (Hymenoptera: Formicidae): role of postpharyngeal glands. **J. Chem. Ecol.**, v.21, p.1127-1148, 1995.

MONNIN, T. & PETERS, C. Dominance hierarchy and reproductive conflicts among subordinates in a monogynous queenless ant. **Behav. Ecol.**, v.10, p.23-32, 1999.

- MORGAN, E.D. Preparation of small scale samples from insects for chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.236, p.227-235, 1990.
- NUNES, T.M.; NASCIMENTO, F.S.; TURATTI, I.C.; LOPES, N.P. & ZUCCHI, R. Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? **Animal Behaviour**, v.75, p.1165–1171, 2008.
- NUNES, T.M.; TURATTI, I.C.C.; LOPES, N.P. & ZUCCHI, R. Chemical signals in the stingless bee, *Frieseomelitta varia*, indicate caste, gender, age and reproductive status. **J. Chem. Ecol.**, v.35, n.10, p.1172-1180, 2009a.
- NUNES, T.M.; TURATTI, I.C.; MATEUS, S.; NASCIMENTO, F.S.; LOPES, N.P. & ZUCCHI, R. Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age. **Genetics and Molecular Research**, v.8, p.589–595 2009b.
- OBIN, M.S. & VANDER MEER, M.K. Sources of nestmate recognition cues in the imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). **Anim. Behav.**, v.36, p.1361-1370, 1988.
- OLDHAM, N.J.; BILLEN, J. & MORGAN, E.D. On the similarity of the Dufour gland secretion and the cuticular hydrocarbons of some bumblebees. **Physiol. Entomol.**, v.19, p.115-123, 1994.
- PIANARO, A.; FLACH, A.; PATRICIO, E.F.R.L.A.; NOGUEIRA-NETO, P. & MARSAIOLI, A.J. Chemical changes associated with the invasion of a *Melipona scutellaris* colony by *Melipona rufiventris* workers. **J. Chem. Ecol.**, v.33, p.971-984, 2007.
- PFENNING, D.R.; GAMBOA, G.J.; REEVE, H.K.; SHELLMAN-REEVE, J. & FERGUSON, I.D. The mechanism of nestmate discrimination in social wasps (Polistes, Hymenoptera: Vespidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.13, p.299-305, 1983.
- POIANI, S.B. & CRUZ-LANDIM, C. Cephalic salivary gland ultrastructure of worker and queen eusocial bees (Hymenoptera, Apidae). **Animal Biology**, v.59, p.299-311, 2009.
- POIANI, S.B. & CRUZ-LANDIM, C. Morphological changes in the cephalic salivary glands of females and males of *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Biosciences**, v.35, n.2, p., 2010a.
- POIANI, S.B. & CRUZ-LANDIM, C. Changes in the size of cephalic salivary glands of *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae) queens and workers in different life phases. **Zoologia**, v.27, n.6, p.961-964, 2010b.
- POIANI, S.B. & CRUZ-LANDIM, C. Cephalic salivary glands of two species of advanced eusocial bees (Hymenoptera: Apidae): morphology and secretion. **Zoologia**, v.27, n.6, p.979-985, 2010c.
- RENOBALES, M.; NELSON, D.R.; MACKAY, M.E.; ZAMBONI, A.C. & BLOMQUIST, G.J. Dynamics of hydrocarbon biosynthesis and transport to the cuticle during pupal and early

adult development in the cabbage looper *Trichoplusia ni* (Lepidoptera, Noctuidae). **Insect Biochemistry**, v.18, p.607-613, 1988.

RUTLER, J.; SIEBEN, S. & SCHRICKER, B. Role of cuticular lipids in nestmate recognition of the European hornet *Vespa crabro* (Hymenoptera, Vespidae). **Insectes Soc.**, v.45, p.169-179, 1998.

RUTLER, J.; SIEBEN, S. & SCHRICKER, B. Nestmate recognition in social wasps: manipulation of hydrocarbon profile induces aggression in European hornet. **Naturwiss.**, v.89, p.111-114, 2002.

SCHORKOPF, D.L.P.; JARAU, S.; FRANCKE, W.; TWELE, R.; ZUCCHI, R.; HRNCIR, M.; SCHMIDT, V.M.; AYASSE, M. & BARTH, F.G. Spitting out information: *Trigona* bees deposit saliva to signal resource locations. **Proc. R. Soc. B.**, v.274, p.895-898, 2007.

SIMPSON, J. The Functions of the Salivary Glands of *Apis mellifera*. **J. Insect Physiol.**, v.4, n.2, p.107-121, 1960.

SINGER, T.L. & SPELIER, K.E. Social wasps use nest paper hydrocarbons for nestmate recognition. **Anim. Behav.**, v.44, p.63-68, 1992.

SLEDGE, M.F.; DANI, F.R.; CERVO, R.; DAPPORTO, L. & TURILLAZZI, S. Recognition of social parasites as nestmates: adoption of colony-specific host cuticular odours by the paper wasp parasite *Polistes sulficer*. **Proc. Roy. Soc. London Serie B – Bio Sci**, v.268, p.2253-2260, 2001.

SOROKER, V. & HEFETZ, A. Hydrocarbon site of synthesis and circulation in the desert ant *Cataglyphis niger*. **J. Insect Physiol.**, v.46, p.1097-1102, 2000.

SOROKER, V.; HEFETZ, A.; COJOCARU, M.; BILLEN, J.; FRANCKE, S. & FRANCKE, W. Structural and chemical ontogeny of the postpharyngeal gland in the desert ant *Cataglyphis niger*. **Physiol. Entomol.**, v.20, p.323-329, 1995.

STANGLER, E.S.; JARAU, S.; HRNCIR, M.; ZUCCHI, R. & AYASSE, M. Identification of trail pheromone compounds from the labial glands of the stingless bee *Geotrigona mombuca*. **Chemoecology**, v.19, p.13-19, 2009.

TERZO, M.; COPPENS, P.; VALTEROVÁ, I.; TOUBEAU, G. & RASMONT, P. Does behaviour replace male scent marking in some bumble bees? Evidence of the absence of sexual marking cephalic secretion in the subgenus *Rhodobombus*. **21st Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology – ISCE: Washington, 2005**, p.145.

WIGGLESWORTH, V.B. **The Principles of Insect Physiology**. London, Methuen, England. 1965.

WIGGLESWORTH, V.B. Structural lipids in the insect cuticle and the function the oenocytes. **Tissue Cell**, v.2, p.155-179, 1970.

Título: Composição química e as possíveis funções da secreção das glândulas salivares cefálicas de operárias de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae) em diferentes fases da vida.

Hipótese: A composição do produto das glândulas salivares cefálicas é diferente segundo a fase da vida/função dos indivíduos possibilitando seu uso em diferentes tarefas e configurando plasticidade glandular.

RESUMO: Grande parte das abelhas eussociais avançadas recrutam companheiras do ninho para a fonte de alimento usando como estratégia substâncias odoríferas voláteis produzidas em glândulas exócrinas. Pesquisas recentes atribuíram à secreção das glândulas salivares cefálicas (GSC) a função de formação de trilha de cheiro. Estudos da morfologia dessas glândulas em algumas espécies de abelhas mostram mudanças nas células glandulares desde a emergência da operária adulta até a passagem para a realização das atividades de forrageio, as quais são sugestivas de mudanças na função secretora. No presente estudo foram analisados os perfis químicos da secreção das GSC de operárias em diferentes fases da vida: recém emergidas (RE), trabalhando na área de cria (AC) e forrageiras (FO) de *Scaptotrigona postica*, através de cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas (CG-EM), com a finalidade de verificar em que medida a composição da secreção muda conforme mudam as atividades desempenhadas pelas operárias. A secreção glandular é constituída por compostos oxigenados, de média volatilidade, incluindo ácidos, alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres e éter, os quais variam em quantidade entre as diferentes fases da vida, aumentando tanto qualitativa quanto quantitativamente conforme o indivíduo passa das atividades intra-coloniais para o trabalho de campo. O grupo RE contém menor quantidade de compostos químicos na secreção glandular, o AC divide-se em 03 subgrupos e o FO apresenta a maior variedade de compostos e estes em maior quantidade. O acetato de 7-hexadecenila e acetato de 5-tetradecenila são os compostos os mais abundantes em FO. Os resultados indicam que a secreção glandular sofre mudanças na composição químicas de acordo com as funções desempenhas pelas operárias. Embora experimentos comportamentais usando extratos glandulares devam ser conduzidos a fim de verificar qual seria a participação da secreção da glândula salivar cefálica na atividade intra e extra-colonial, a hipótese de sua relação com a fase/função das operárias pode ser aceita.

PALAVRAS-CHAVE: Abelha. Cromatografia em fase gasosa. Feromônio. Glândula labial.

ABSTRACT: Most of advanced eusocial bees recruit nestmate to food source. Recently studies attributed to the cephalic salivary glands (CSG) the function to produce scent trail pheromone. Studies on those glands cell's morphology shown glandular changes from newly emerged workers to foragers ones, that might be correlated to changes in the secretion produced. In the present study the secretion chemical profiles of CSG were analyzed in workers in different phases of life: newly emerged (RE), working on combs area (AC) and foragers (FO) by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), with the purpose to verify if the secretion

composition changes as the workers change their tasks. The results showed that glandular secretion is constituted by oxygenated compounds, with middle volatility, including acids, alcohols, aldehydes, ketones, esters and ether, which quantity varies among different phases of life, increasing qualitative and quantitatively as the individual undergoes from intra- to extra-colonial activities. The RE group contains the smallest amount of chemical compounds in glandular secretion, the AC groups is separated in 03 subgroups according to chemical constitution of the secretion; and FO group has larger amounts and variety of compounds than other studied groups. The 7-hexadecenil acetate and 5-tetradecenil acetate are the major compounds in foragers glands secretion. The results indicate that the chemical glandular secretion is phase/task-related as hypothesized, however bioassays with glandular extracts should be carry out to verify the participation of CSG secretion in intra and extra-colonial activities and its function as scent trail pheromone.

KEYWORDS: Bee. Gas chromatography. Labial glands. Pheromone.

1. INTRODUÇÃO

A morfologia das células secretoras e grau de desenvolvimento das glândulas salivares céfalicas (GSC) de operárias de *Apis mellifera* e *Scaptotrigona postica* mudam com a fase/tarefa desempenhada na colônia sugerindo mudanças na intensidade da atividade secretora e/ou mudanças na composição da secreção. A glândula inicia a produção de secreção quando da emergência do adulto e esta se acumula continuamente na luz alveolar, sendo principalmente utilizada nas atividades de campo (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2009, 2010a,b,c).

No entanto, a função da GSC das abelhas não está totalmente elucidada e varia entre as espécies, sexos, castas e atividades desempenhadas pelos indivíduos da colônia. Heselhaus (1922) foi um dos primeiros a sugerir uma função para a secreção da GSC de *A. mellifera*, a qual seria amolecer a cera durante sua manipulação na construção do ninho. Posteriormente, Simpson (1960) atribuiu-lhe a finalidade de lubrificação das peças bucais.

Em meliponíneos, estudos recentes revelaram que algumas espécies do gênero *Trigona* (JARAU et al., 2004; 2006; 2010; SCHORKOPF et al., 2007) e em *Geotrigona mombuca* (STANGLER et al., 2009) a secreção das GSC é usada para a formação de trilha de cheiro para indicar a fonte de alimento às companheiras de ninho. Nas diferentes espécies de *Bombus* ocorre variação não só quanto ao desenvolvimento dessa glândula entre os sexos,

mas também em relação aos compostos encontrados e a função da secreção (KULLENBERG et al., 1973; BERGMAN & BERGSTRÖM, 1997; BERTSCH et al., 2005; TERZO et al., 2005). Em *A. mellifera*, hidrocarbonetos presentes na secreção dessas glândulas, estão também presentes na cutícula de operárias forrageiras (ARNOLD & DELAGE-DARCHEN, 1978; ARNOLD et al., 1996; Capítulo 4.2 desta tese).

Entretanto, não há estudos mais abrangentes sobre o perfil químico da secreção das GSC nas abelhas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar os compostos químicos que ocorrem na secreção glandular de operárias nas diferentes fases/funções da vida de *S. postica* uma espécie nativa de abelha sem ferrão, em busca de uma possível correlação entre as mudanças de composição e o *status* da operária.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Para as análises químicas da secreção glandular por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa (CG-EM) foram utilizadas GSC de operárias em diferentes fases da vida: recém emergidas (RE); trabalhando na área de cria (AC); e forrageiras (FO) de *S. postica*, retiradas de uma única colônia no meliponário da Universidade Estadual Paulista UNESP, Instituto de Biociências de Rio Claro.

Inicialmente foram utilizadas as GSC de 08 RE, 08 AC e 08 FO. Fez-se necessária a análise de maior quantidade de glândulas da fase AC já que esta apresentou constituição química glandular muito variável, deste modo mais 14 glândulas de AC foram analisadas, somando-se 22 amostras glandulares para esta fase.

2.2. Métodos

2.2.1. Análise do perfil químico da secreção glandular

As análises químicas foram conduzidas no Lennard-Jones Laboratories junto ao Chemical Ecology Group na Keele University, United Kingdom, sob supervisão do Dr. E.D. Morgan e Dr. Falko P. Drijfhout. Usou-se um aparelho de cromatografia em fase gasosa (Hewlett-Packard 6890) equipado com uma coluna HP-5MS (30 metros de comprimento,

0.25mm de diâmetro). O cromatógrafo está acoplado diretamente a um 5973 Detector de Massas (Espectrômetro de Massas utilizando ionização por impacto de elétrons -70eV).

As amostras foram preparadas de acordo com a metodologia para análise por injeção sólida desenvolvida por Morgan (1990). As glândulas foram dissecadas e inseridas, separadamente, em capilares de vidro, finos e de fundo cego com aproximadamente 5cm de comprimento. Após a inserção das glândulas, a outra extremidade do capilar foi selada com chama. Em seguida, os capilares foram inseridos no interior do cromatógrafo e quebrados para liberação dos compostos e sua análise. Foi inserida apenas uma glândula por capilar e apenas um capilar introduzido no CG-EM por vez.

As amostras foram conduzidas no modo *splitless*. O protocolo de temperatura utilizado foi de 40°C, mantida por 1 minuto, e aumentada posteriormente até 320°C a uma taxa de 15°C/min., a qual foi mantida por 10 minutos. Foi utilizado Hélio como gás carreador a uma taxa constante de 1.0ml/min.

A quantificação foi realizada com base nas áreas dos picos obtidos nos cromatogramas (SINGER & ESPELIE, 1992). A identificação dos compostos foi realizada através de comparações dos espectros de massa com a biblioteca Wiley e com dados de íons diagnósticos presentes na literatura.

2.2.2. Análises Estatísticas

As análises dos resultados foram feitas usando-se testes estatísticos multivariados:

1. Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA): com a finalidade de verificar como os indivíduos estão distribuídos nas fases pré-estabelecidas (RE, AC e FO) de acordo com as similaridades entre eles, fazendo-se uso de todos os compostos químicos encontrados na secreção glandular;

2. Análise da Componente Principal (ACP): com o objetivo de correlacionar os compostos e as fases das operárias;

3. Análise Discriminante (AD): com a finalidade de verificar se as fases estão corretamente classificadas dentro dos grupos pré-estabelecidos (RE, AC e FO) além de identificar quais compostos químicos são os responsáveis pela discriminação entre eles. Para a realização da AD, foram selecionados apenas os compostos comuns a todas as fases estudadas.

Para todas as análises estatísticas foi utilizado o programa XLSTAT 2011.

3. RESULTADOS

A secreção das GSC de operárias de *S. postica* apresenta conteúdo químico variado, qualitativa e quantitativamente não só entre as fases analisadas como também dentro das fases. De um modo geral, os compostos encontrados abrangem ácidos, alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres e éter (Tabela 1). Todos os compostos receberam abreviaturas de identificação do composto (ID) para realização dos testes estatísticos e foram listados na Tabela 1.

As GSC de RE produzem pouca secreção, sendo os compostos 2-tridecanona e oleato de etil os mais representativos dentre os 09 compostos encontrados. O grupo AC apresentou variações qualitativas e quantitativas na secreção glandular de tal forma que foi possível separá-lo em 03 subgrupos: AC1, AC2 e AC3. Foram encontrados 08 compostos na secreção glandular de AC1, com destaque para a 2-tridecanona e o oleato de etil que como em RE foram os mais abundantes. Maior variedade e quantidade de compostos foram observadas nos demais grupos. A secreção de AC2 contém 16 compostos dos quais o ácido hexadecanóico e o decanal foram os predominantes. Já o grupo AC3 caracterizou-se por apresentar o acetato de 7-hexadecenila e o acetato de 5-tetradecenila perfazendo juntos quase 50% da constituição da secreção glandular sendo que foram encontrados 15 compostos diferentes. O grupo FO apresentou os mesmos acetatos (7-hexadecenila e 5-tetradecenila) como os principais compostos glandulares. Nesta fase da operária, 26 compostos foram encontrados (Tabela 1).

Os 03 compostos pertencentes ao grupo químico funcional das cetonas estão presentes em todas as fases da vida das operárias, entretanto a quantidade aumenta ou diminui conforme o indivíduo passa das atividades intra-nidais para tarefas de campo. As concentrações de 2-tridecanona e 2-pentadecanona tendem a diminuir enquanto a de 2-heptadecanona tende a aumentar quando a operária passa a forragear.

A AHA separou as operárias em 03 grandes grupos. Os indivíduos RE foram agrupados juntamente com os de AC1 com exceção de um indivíduo RE que não se encaixou neste primeiro grande grupo. O segundo grande grupo ficou formado pelas AC2 e o indivíduo RE discordante. O terceiro grande grupo no dendrograma contém os indivíduos AC3 e FO (Figura 1).

O teste ACP também dividiu as operárias em 03 grandes grupos (Figura 2A) além de correlacioná-los com os compostos químicos encontrados na secreção (Figura 2A,B). As 03 primeiras componentes principais F1, F2 e F3 geradas pela ACP explicam 51,20% da

variabilidade das amostras e o gráfico da componente principal 1 (F1) *versus* a componente principal 2 (F2) é mostrado na Figura 2A. Observando-se as Figuras 2A,B, é possível verificar quais compostos estão correlacionados aos grupos de operárias formados pela ACP.

As AHA e ACP não fornecem informações sobre os pesos significativos dos compostos químicos para determinar os agrupamentos. Deste modo, a AD foi realizada com o objetivo de verificar se os indivíduos representam adequadamente os grupos para os quais foram pré-determinados no momento da coleta e identificar quais compostos químicos são mais importantes para a discriminação entre eles. As 03 cetonas, 2-tridecanona, 2-pentadecanona e 2-heptadecanona, foram usadas na AD, já que são os únicos compostos presentes em todas as fases aqui estudadas. A AD revelou que a 2-tridecanona é o composto mais importante, responsável pela discriminação entre os grupos. A distância de Fisher revelou que RE e AC1 diferem de todos os demais grupos (AC2, AC3 e FO). Entretanto, estes 03 últimos grupos não se discriminam entre si (Tabela 2).

A AD permitiu obter a distância entre os grupos, verificada através da análise de distância de Mahalanobis (Tabela 3) a qual determina a média da variável mais importante (no caso a 2-tridecanona) em cada um dos grupos. Essa média de cada grupo é chamada de centróide. Os centróides indicam o local mais típico de qualquer indivíduo de um grupo e uma comparação dos centróides dos diferentes grupos mostra o quão afastados ou próximos estão os grupos entre si. Segundo a Tabela 3, os grupos RE e AC1 estão mais próximos entre si, como também observado no dendrograma resultante da AHA, enquanto AC2, AC3 e FO estão mais próximos entre si. Os centróides obtidos para os grupos RE, AC1, AC2, AC3 e FO estão representados na Figura 3.

Tabela 1. Média e desvio padrão (DP) dos compostos químicos encontrados na secreção das glândulas salivares cefálicas de operárias recém emergidas (RE), trabalhando na área de cria (AC) e forrageiras (FO) de *Scaptotrigona postica*. Os compostos que apresentaram concentração relativa abaixo de 0.05% foram tratados como traços (*t*). ID = identificação do composto. TR = tempo de retenção.

ID	TR	Compostos	RE (n=8) Média ± DP	AC1 (n=3) Média ± DP	AC2 (n=5) Média ± DP	AC3 (n=14) Média ± DP	FO (n=8) Média ± DP
<i>Ácidos</i>							
A1	7.50	Ácido nonanóico	-	-	0.70 ± 0.95	-	0.20 ± 0.53
A2	8.38	Ácido decanóico	-	-	5.30 ± 3.58	-	1.00 ± 2.82
A3	9.95	Ácido dodecanóico	-	-	0.46 ± 1.01	-	-
A4	11.47	Ácido tetradecanóico	-	-	8.42 ± 5.22	-	0.32 ± 0.85
A5	12.14	Ácido pentadecanóico	-	-	-	1.80 ± 1.76	0.15 ± 0.41
A6	12.89	Ácido hexadecanóico	5.79 ± 1.36	-	30.88 ± 12.09	-	0.48 ± 1.34
<i>Alcoóis</i>							
A17	9.57	2-Tridecanol	-	7.96 ± 4.35	0.45 ± 0.98	-	-
A18	10.74	5-Tetradecen-1-ol	-	-	-	0.33 ± 1.56	4.69 ± 5.25
A19	12.22	7-Hexadecen-1-ol	-	-	-	1.29 ± 3.52	11.2 ± 8.93
A110	12.54	2-Heptadecanol	-	-	-	2.91 ± 5.03	0.40 ± 0.57
<i>Aldeídos</i>							
Ad11	4.77	Octanal	-	-	1.75 ± 0.07	-	0.33 ± 0.88
Ad12	6.10	Nonanal	6.15 ± 12.03	-	7.39 ± 3.42	-	0.99 ± 2.65
Ad13	7.07	Decanal	3.31 ± 9.34	-	16.46 ± 9.80	-	3.12 ± 8.77
Ad14	7.87	2-Decenal	-	-	-	-	<i>t</i>
Ad15	8.00	Undecanal	-	-	0.79 ± 0.80	-	0.25 ± 0.67
Ad16	8.79	2-Undecenal	-	-	0.20 ± 0.43	<i>t</i>	<i>t</i>
Ad17	10.62	Tetradecanal	-	-	-	-	<i>t</i>
Ad18	11.90	7-Hexadecenal	-	2.96 ± 1.12	-	0.48 ± 0.72	0.09 ± 0.14
<i>Cetonas</i>							
C19	7.79	2-Undecanona	-	-	-	<i>t</i>	-
C20	9.67	2-Tridecanona	64.41 ± 27.25	53.18 ± 18.83	9.02 ± 8.84	3.08 ± 2.49	0.46 ± 0.79
C21	11.23	2-Pentadecanona	1.35 ± 3.79	8.51 ± 4.23	2.27 ± 2.55	1.10 ± 1.00	0.18 ± 0.14
C22	12.67	2-Heptadecanona	0.22 ± 0.61	1.52 ± 0.88	4.60 ± 4.46	7.31 ± 3.05	4.45 ± 2.33
<i>Ésteres</i>							
E23	10.17	Dodecanoato de etila	-	-	-	0.11 ± 0.18	<i>t</i>
E24	11.62	Butirato de dodecila	-	-	-	2.03 ± 2.49	1.69 ± 1.85
E25	11.69	Butirato de 2-tridecanila	-	3.05 ± 1.51	-	-	-
E26	12.88	Acetato de 5-Tetradecen-1-ila	-	-	2.32 ± 2.16	19.01 ± 4.53	17.71 ± 6.22
E27	13.01	Butirato de tetradecanila	-	-	-	7.15 ± 2.64	5.53 ± 2.50
E28	13.68	Oleato de metila	1.09 ± 3.07	3.26 ± 2.17	-	-	0.11 ± 0.11
E29	14.07	Oleato de etila	13.25 ± 9.57	16.59 ± 6.60	-	-	-
E30	14.14	Acetato de 7-hexadecen-1-ila	4.45 ± 2.50	-	7.42 ± 6.40	52.52 ± 9.71	43.45 ± 12.47
<i>Éter</i>							
T31	14.27	1-Metoxi eicosano	-	-	-	-	1.01 ± 0.89

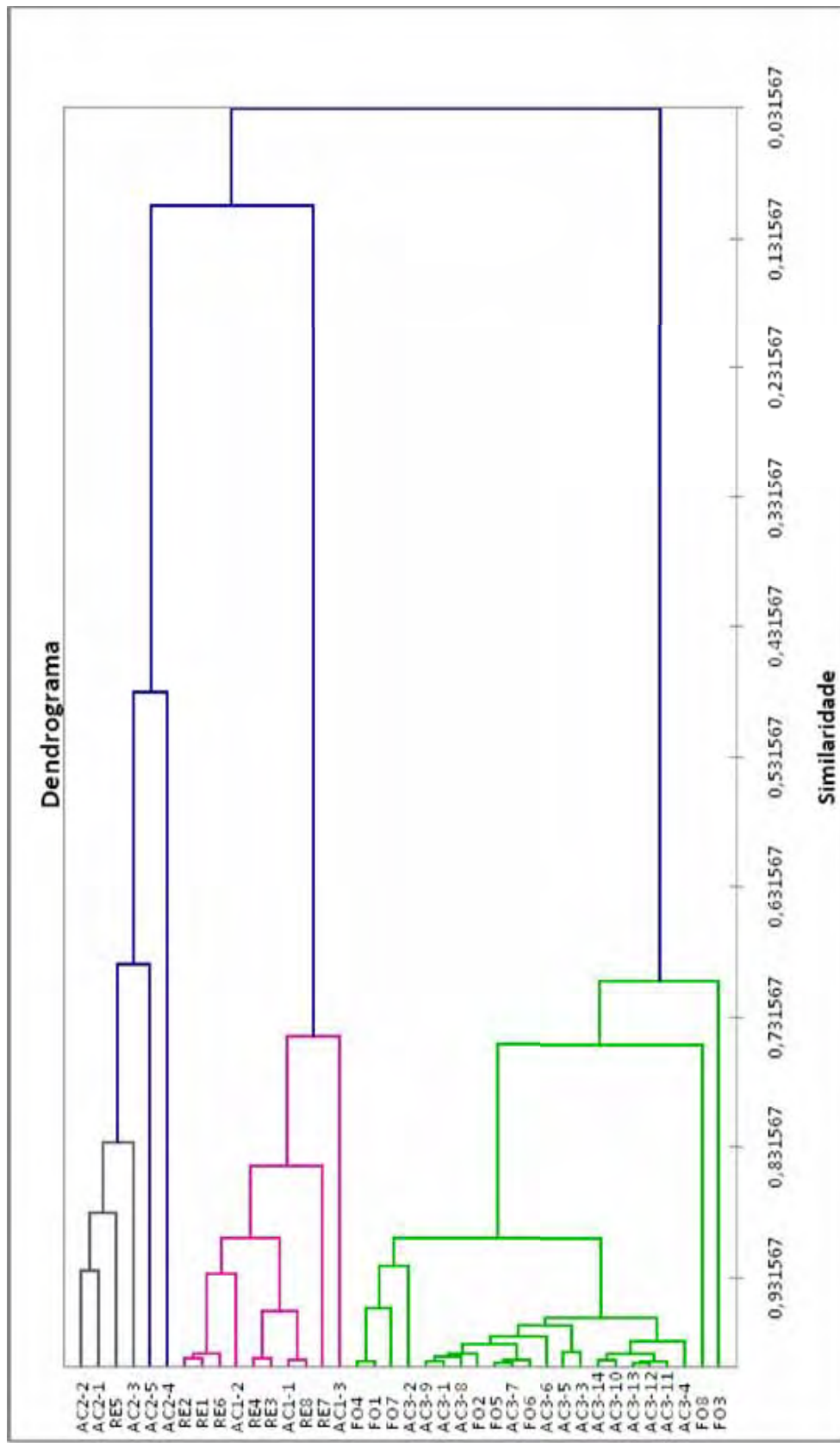


Figura 1. Dendrograma obtido através da análise hierárquica de agrupamento (AHA) mostrando a formação de 03 grandes grupos. Observa-se que as operárias trabalhando na área de cria (AC) ficaram divididas em 03 subgrupos (AC1, AC2 e AC3), como também apresentado na Tabela 1. O subgrupo AC1 apresenta similaridade com RE (recém emergidas); AC2 juntamente com um indivíduo do grupo RE representam um grupo intermediário entre o anterior citado e o terceiro grupo, formado por AC3 e FO (forrageiras).

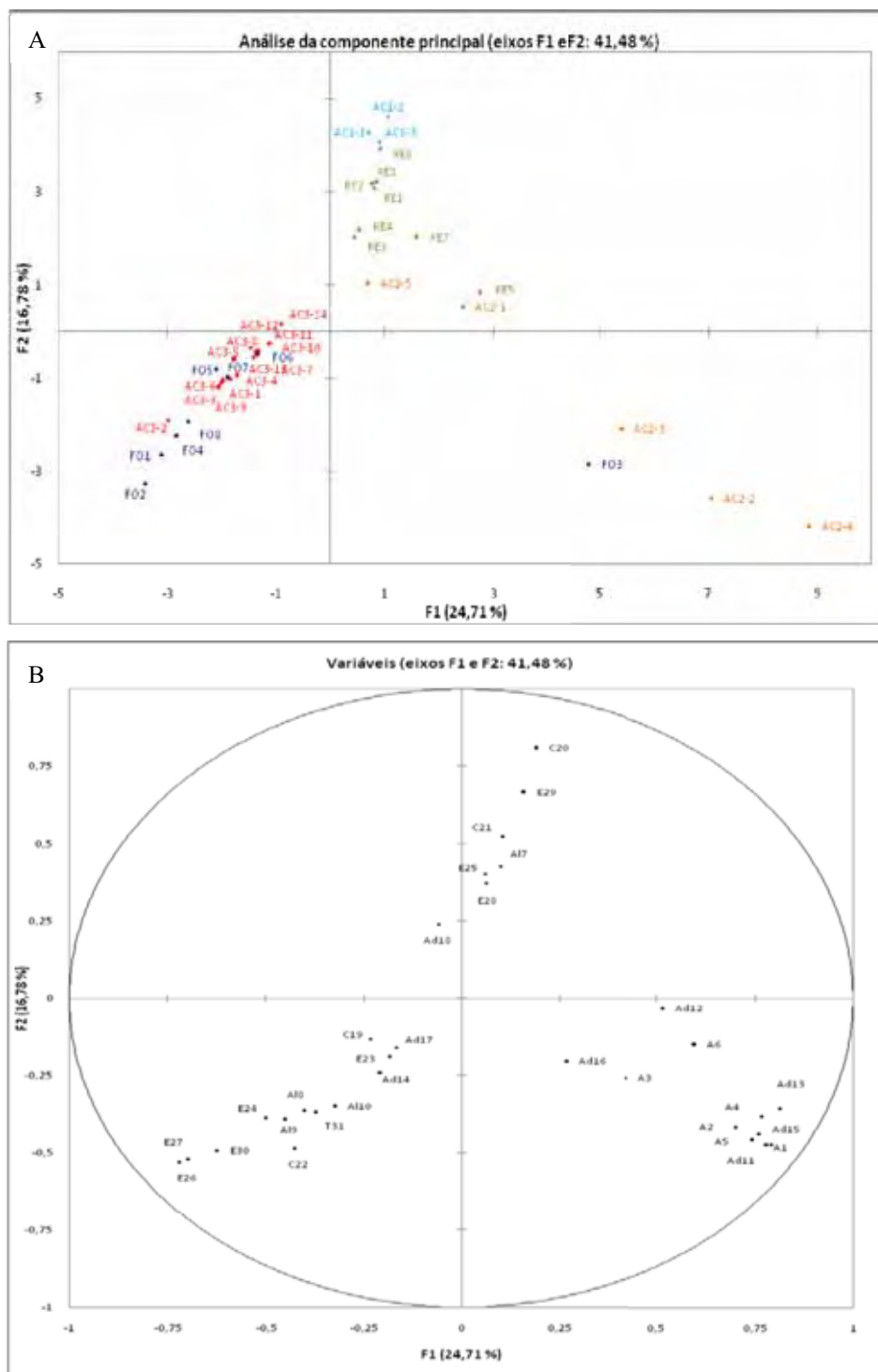


Figura 2A,B. Gráficos resultantes da análise da componente principal (ACP). As componentes principais F1 e F2 explicam 41,48% da variabilidade das amostras. A) Três grupos são formados: RE e AC1; AC3 e FO; e alguns indivíduos de AC2 parecem tender para o primeiro grupo (RE e AC1) e os outros indivíduos de AC2 agrupam-se com FO3. B) Os compostos químicos representados por suas identificações (IDs) (Tabela 1) estão distribuídos nos quadrantes correspondentes aos grupos formados e apresentados em “A”. RE = operárias recém emergidas; AC = operárias trabalhando na área de cria; FO = operárias forrageiras.

Tabela 2. Os valores de p para distância de Fisher indicam discriminação entre grupos quando $p < 0.0001$. Notar que RE e AC1 separam-se entre si e dos demais grupos, enquanto AC2, AC3 e FO não se distinguem.

	AC1	AC2	AC3	FO	RE
AC1	1	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
AC2	< 0,0001	1	0,134	0,465	< 0,0001
AC3	< 0,0001	0,134	1	0,162	< 0,0001
FO	< 0,0001	0,465	0,162	1	< 0,0001
RE	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	1

Tabela 3. Os valores da distância de Mahalanobis indicam a distância entre os grupos através do centróide. O centróide foi obtido através da média do composto 2-tridecanona de cada grupo por ser este o composto com maior poder discriminante.

	AC1	AC2	AC3	FO	RE
AC1	0	17,174	28,261	24,799	15,831
AC2	17,174	0	1,738	0,908	24,798
AC3	28,261	1,738	0	1,149	32,570
FO	24,799	0,908	1,149	0	27,895
RE	15,831	24,798	32,570	27,895	0

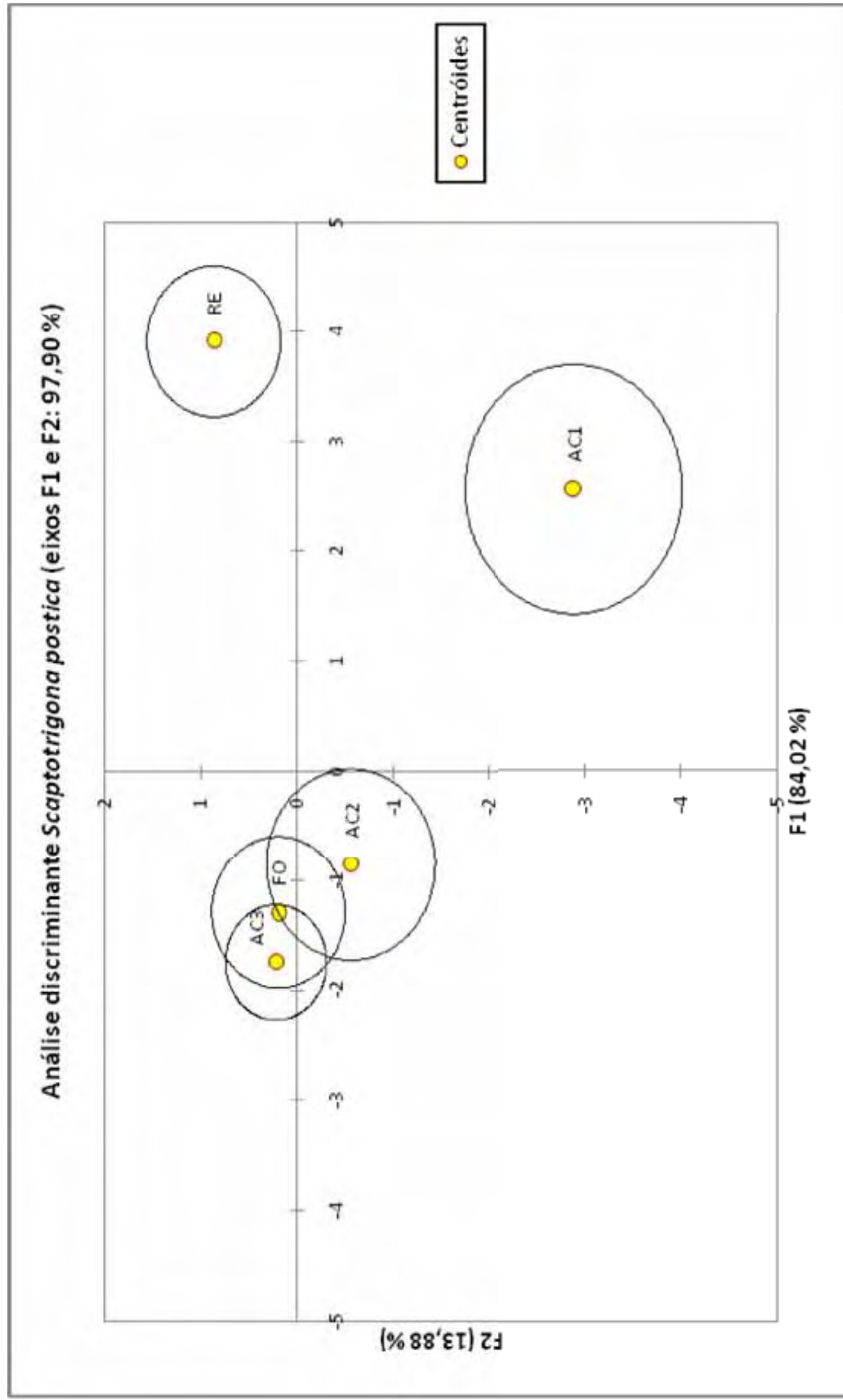


Figura 3. Análise discriminante (AD) indicando a posição dos centróides. Os grupos RE e AC estão completamente separados entre si e dos demais grupos, os quais apresentam sobreposições indicando maior proximidade entre os grupos e semelhanças químicas no perfil da secreção glandular. O composto químico responsável pela discriminação dos grupos RE e AC1 e de AC2, AC3 e FO é a 2-tridecanona.

4. DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostram que ocorrem diferenças na composição da secreção glandular nas diferentes fases de vida das operárias de *S. postica* e que a diversidade de grupos funcionais dos compostos químicos e a quantidade dos mesmos aumentam conforme o indivíduo passa das atividades intra-coloniais para atividades de coleta no campo, o que confere com o verificado nos estudos morfológicos e morfométricos desenvolvidos por Poiani e Cruz-Landim (2009; 2010a,b,c).

A modificação na composição da secreção ocorre de maneira gradativa e possivelmente está correlacionada com as mudanças de “status” ou de função do indivíduo no contexto colonial. Os resultados mostram uma transição gradual no conteúdo glandular de RE para FO, já que as operárias AC1 apresentam os mesmos principais compostos encontrados na secreção glandular de RE, e o grupo AC3 apresenta os mesmos principais compostos que FO.

Os indivíduos do grupo RE foram coletados assim que emergiram de modo que não estavam desempenhando nenhuma tarefa específica na colônia. Nesta fase a operária inicia a produção e o acúmulo de secreção para tarefas futuras. O grupo AC está constituído por abelhas capturadas enquanto em atividade no favo de cria. A heterogeneidade na composição da secreção deste grupo resultou em sua divisão em subgrupos (AC1, AC2 e AC3). A heterogeneidade pode ser explicada pelo fato de que nesta fase da vida as operárias executam uma grande variedade de tarefas intra-coloniais, as quais incluem manuseio da cera para construção de alvéolos, abastecimento destes com alimento para a cria, fechamento dos alvéolos onde a rainha realizou postura, além de elas próprias realizarem postura de ovos tróficos ou funcionais. Soma-se a isso que esta é uma fase de amadurecimento da operária e de transição para as atividades externas ao ninho. A captura das operárias desta fase foi feita na área de cria de maneira aleatória sem observação de que tarefa estava sendo executada, portanto, não é possível dizer se as variações na composição da secreção refletem as diferentes funções das operárias desta fase, mas é certo que refletem a transição das tarefas internas para as externas.

Poiani e Cruz-Landim (2009; 2010a,b,c) interpretaram o fato das GSC encontrarem-se mais túrgida nas operárias forrageiras como o sinal de que a secreção era acumulada durante as fases anteriores para ser usada nesta. Contudo, os presentes resultados sugerem que esta possa estar também sendo usada nas tarefas intra-coloniais.

Santos et al. (2009) atribuíram ao produto das GSC de *P. emerina*, auxílio no manuseio de resinas coletadas e usadas na colônia. No entanto, a secreção das GSC de FO de *S. postica* tem como principais compostos os ésteres acetato de 7-hexadecenila e acetato de 5-tetradecenila, compostos de média volatilidade o que os faz candidatos a possível função feromonal. Assim não fica descartada a sugestão da função de formação de trilha de cheiro para recrutamento de companheiras do ninho para fontes de alimento, como já demonstrado para outras espécies de meliponíneos, nas quais os ésteres também são apontados como principais compostos das GSC. O decanoato de hexila contido nas GSC de *Trigona recursa* foi o primeiro feromônio relacionado com formação de trilha de cheiro descrito para meliponíneos (JARAU et al., 2006). Após este primeiro estudo, Schorkopf et al. (2007) encontram na secreção glandular de *T. spinipes* o octanoato de octila, Stangler et al. (2009) verificaram a presença de butanoato de farnesil nas secreções das GSC de *Geotrigona mombuca* e Jarau et al (2010) descreveram que a secreção das GSC de operárias forrageiras de *T. corvina* é composta por variados ésteres que atuam na marcação de trilha de cheiro.

O acetato de 7-hexadecenila é também o principal composto encontrado nas GSC de machos de *Bombus sylvarum* (BERGSTRÖM et al., 1985) e provavelmente exerce função de feromônio de marcação de rotas de vôo. Já em *Bombus terrestris*, a mesma função feromonal é exercida pelo composto 2,3-dihydrofarnesol, também encontrado nas GSC (ŠOBOTNÍK et al., 2008). Nota-se, portanto, que há uma variação na função de um mesmo composto em espécies diferentes (acetato de 7-hexadecenila em *B. sylvarum* e *S. postica**) e da mesma função (marcação de trilha de cheiro) sendo exercida por compostos diferentes (*T. recursa*, *T. spinipes*, *G. mombuca*, *T. corvina*, *B. sylvarum* e *B. terrestris*).

Estudos que analisaram a composição da secreção glandular de *Apotrigona nebulata* (DELAGE-DARCHEN et al., 1979), *Melipona beecheii* (DELAGE-DARCHEN & DARCHEN, 1982) e *Scaptotrigona mexicana* (DELAGE-DARCHEN et al., 1982), não resultaram em sugestões sobre as possíveis funções nestas espécies. Mas na abelha solitária *Chalicodoma sicola* foi detectada a presença de hidrocarbonetos nas GSC que são usados para impermeabilizar as células de cria, as quais são feitas de barro (KRONENBERG & HEFETZ, 1984). Em *A. mellifera* (ARNOLD & DELAGE-DARCHEN, 1978; ARNOLD et al., 1996; Capítulo 4.2 desta tese), *Bombus (Rhodobombus) mesomelas* (TERZO et al., 2005) e *Melipona quadrifasciata* (Capítulo 4.2 desta tese), foram encontrados os mesmos

* Levando-se em consideração que se sugere função de trilha de cheiro para esta espécie, porém bioensaios devem ser conduzidos a fim de elucidar tal sugestão.

hidrocarbonetos na secreção glandular e na epicutícula que recobre o corpo destas abelhas. No presente trabalho, não foram encontrados hidrocarbonetos na secreção glandular.

As abelhas do gênero *Bombus* têm sido amplamente usadas nas investigações da composição química da secreção das GSC e sua função nas diferentes espécies. Os machos de *Bombus pratorum* produzem em suas glândulas farnesol, acetato de geranilgeranil, acetato de farnesil, (Z)-11-octadecanol, hexadecanol e pentacosadieno, enquanto os machos de *Bombus lapidarius* produzem (Z)-9-hexadecenol e hexadecanol. Nestas espécies a secreção é usada para marcar com cheiro as rotas de vôo e atrair rainhas virgens (KULLENBERG et al., 1973; BERGMAN & BERGSTRÖM, 1997). As subespécies de *B. terrestris* apresentam variações na composição química de suas GSC, sendo o (E)-2,3-diidrofarnesol o principal composto encontrado em *B. t. dalmatinus* e *B. t. sassaricus*, enquanto o dodecanoato de diidrofarnesil é o principal composto em *B. t. terrestris* e *B. t. lusitanicus* (COPPÉE et al, 2008).

Em conclusão pode-se dizer que ao longo da vida da operária de *S. postica* ocorrem mudanças qualitativas e quantitativas na composição da secreção das GSC, as quais permitem separá-las segundo as fases a que foram previamente alocadas e que assim sendo têm potencialidade para sinalizarem no interior e no exterior da colônia as atividades que estão sendo ou devem ser desempenhadas, conforme hipótese formulada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOLD, G. & DELAGE-DARCHEN, B. Nouvelles donnés sur l'équipement enzymatique des glandes salivaires de l'ourivière d' *Apis mellifera* (Hyménoptère, Apide). **Ann. Sc. Nat. Zool.**, 12^a série, v.20, p.401-422, 1978.
- ARNOLD, G.; QUENET, B.; CORNUET, J.M.; MASSON, C.; SCHEPPER, B. DE; ESTOUP, A. & GASQUI, P. Kin recognition in honey bees. **Nature**, v.379, p.498, 1996.
- BERGMAN, P. & BERGSTRÖM, G. Scent marking, scent origin, and species specificity in male pre mating behavior of two scandinavian bumblebees. **J. Chem. Ecol.**, v.23, n.5, p.1235-1251, 1997.
- BERGSTRÖM, G.; APPELGREN, M.; SVENSSON, B.G.; ÅGREN, L.; DESCOINS, C.; FREROT, B.; GALLOIS, M. & LETTERE, M. Marking pheromones of *Megabombus sylvarum* (L.) and *M. ruderarius* (Müller) males (Hymenoptera: Apidae). **Apidologie**, v.16, n.1, p.57-68, 1985.
- BERTSCH, A.; SCHWEER, H.; TITZE, A. & TANAKA, H. Male labial gland secretions and mitochondrial DNA markers support species status of *Bombus cryptarum* and *Bombus magnus* (Hymenoptera, Apidae). **Insect Soc.**, v.52, p.45–54, 2005.

COPPÉE, A.; TERZO, M.; VALTEROVÁ, I. & RASMONT, P. Intraspecific variation of the cephalic labial gland secretions in *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae). **Chemistry & Biodiversity**, v.5, n.12, p.2654-2661, 2008.

DELAGE-DARCHEN, B. & DARCHEN, R. Les enzymes digestives des glandes salivaires et de l'intestin moyen d'une abeille sociale du Mexique, *Melipona beecheii* (B.) **Ann. Sc. Nat. Zool.**, 13^a série, v.4, p.91-96, 1982.

DELAGE-DARCHEN, B.; TABEC, S. & DARCHEN, R. Secretion Enzymatique des Glandes Salivaires et de L'Intestin Moyen d'une Abeille Sans Dard, *Apotrigona nebulata* (Sur.) (Hyménoptères, Apidés). **Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.**, v.13, p.261-267, 1979.

DELAGE-DARCHEN, B.; CONCONI, J.R. & AGUILAR, I.C. Comparaison entre L'Équipement enzymatique des glandes salivaires et de l'intestinmoyen dès diverses espèces d'abeilles sociales. **Apidologie**, v.13, p.265-273, 1982.

HESELHAUS, F. Die Hautchüsen der Apiden und Verwandter formen. **Zool. Jahrb. Jena Abt. J. Anat.**, v.43, p.363-464, 1922.

JARAU, S.; HRNCIR, M.; ZUCCHI, R. & BARTH, F.G. A stingless bee uses labial gland secretions for scent trail communication (*Trigona recursa*, Smith 1863). **J. Comp. Physiol. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v.190, p.233-239, 2004.

JARAU, S.; SCHULZ, M.; HANCIR, M.; FRANCKE, W.; ZUCCHI, R.; BARTH, F.G. & AYASSE, M. Hexyl decanoate, first trail pheromone compound identified in a stingless bee, *Trigona recursa*. **J. Chem. Ecol.**, v.32, p.1555-1564, 2006.

JARAU, S.; DAMBACHER, J.; TWELE, R.; AGUILAR, I.; FRANCKE, W. & AYASSE, M. The trail pheromone of a stingless bee, *Trigona corvine* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), varies between population. **Chemical Senses**, v.35, n.7, p.593-601, 2010.

KRONENBERG, S. & HEFETZ, A. Role of labial glands in nesting behaviour of *Chalicodoma sicola* (Hymenoptera, Megachilidae). **Physiol. Entomol.**, v.9, p.145-179, 1984.

KULLEMBERG, B.; BERGSTRÖM, G.; BRINGER, B.; CALBERG, B. & CEDERBERGER, B. Observation of scent marking by *Bombus* Latr. and *Psithyrus* Lep. Males (Hym., Apidae) and localization of site of production of the secretion. **Zoom. Suppl.**, v.1, p.23-30, 1973.

MORGAN, E.D. Preparation of small scale samples from insects for chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.236, p.227-235, 1990.

POIANI, S.B. & CRUZ-LANDIM, C. Cephalic salivary gland ultrastructure of worker and queen eusocial bees (Hymenoptera, Apidae). **Anim. Biol.**, v.59, p.299-311, 2009.

POIANI, S.B. & CRUZ-LANDIM, C. Morphological changes in the cephalic salivary glands of females and males of *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae). **J. Biosci.**, v.35, n.2, p.249-255, 2010a.

POIANI, S.B & CRUZ-LANDIM, C. Changes in the size of cephalic salivary glands of *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae) queens and workers in different life phases. **Zoologia**, v.27, n.6, p.961-964, 2010b.

POIANI, S.B & CRUZ-LANDIM, C. Cephalic salivary glands of two species of advanced eusocial bees (Hymenoptera, Apidae): morphology and secretion. **Zoologia**, v.27, n.6, p.979-985, 2010c.

SANTOS, C.G.; MEGIOLARO, F.; SERRÃO, J.E. & BLOCHTEIN, B. Morphology of the head salivary and intramandibular glands of the stingless bee *Plebeia emerina* (Frise) (Hymenoptera, Meliponini) workers associated with propolis. **Annals of the Entomological Society of America**, v.102, p.137-143, 2009.

SCHORKOPF, D.L.P.; JARAU, S.; FRANCKE, W.; TWELE, R.; ZUCCHI, R.; HRNCIR, M.; SCHMIDT, V.M.; AYASSE, M. & BARTH, F.G. Spitting out information: *Trigona* bees deposit saliva to signal resource locations. **Proc. R. Soc. B.**, v.274, p.895-898, 2007.

SIMPSON, J. The Functions of the Salivary Glands of *Apis mellifera*. **J. Insect Physiol.**, v.4, n.2, p.107-121, 1960.

SINGER, T.L. & SPELIER, K.E. Social wasps use nest paper hydrocarbons for nestmate recognition. **Animal Behaviour**, v.44, p.63-68, 1992.

STANGLER, E.S.; JARAU, S.; HRNCIR, M.; ZUCCHI, R. & AYASSE, M. Identification of trail pheromone compounds from the labial glands of the stingless bee *Geotrigona mombuca*. **Chemoecology**, v.19, p.13-19, 2009.

ŠOBOTNÍK, J.; KALINOVÁ, B.; CAHLÍKOVÁ, L.; WEYDA, F.; PTÁČEK, V. & VALTEROVÁ, I. Age-dependent changes in structure and function of the male labial gland in *Bombus terrestris*. **J. Insect Physiol.**, v.54, p.204-214, 2008.

TERZO, M.; COPPENS, P.; VALTEROVÁ, I.; TOUBEAU, G. & RASMONT, P. Does behaviour replace male scent marking in some bumble bees? Evidence of the absence of sexual marking cephalic secretion in the subgenus *Rhodobombus*. **21st Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology – ISCE**: Washington, 2005, p.145.

Título: Perfil químico da superfície cuticular de operárias de *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae) desempenhando diferentes funções na colônia.

Hipótese: É possível separar as operárias em grupos definidos levando em conta a composição química cuticular.

RESUMO: A cutícula dos insetos é recoberta por uma camada impermeável de ceras cuja função primária é a proteção do indivíduo contra desidratação. Entretanto, durante o processo evolutivo, os compostos presentes na cutícula adquiriram funções na comunicação, tais como reconhecimento inter e intra-específico, gênero, estado fisiológico e fertilidade do indivíduo. No caso dos insetos eussociais, a casta das operárias exerce, ao longo da vida, várias funções em um processo denominado polietismo etário. Nesse caso, as informações fornecidas pelos compostos cuticulares têm significado importante no contexto social na medida em que servem não só para discriminar companheiras e não companheiras de ninho, além de fornecerem pistas específicas para identificação da fase da vida ou tarefas por elas executadas. O presente estudo teve a finalidade de identificar os compostos químicos presentes na superfície da cutícula de operárias de *Scaptotrigona postica* em diferentes fases da vida (recém emergidas - RE; trabalhando na área de cria ou favo - AC; e forrageiras - FO) através de cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa (CG-EM), e comparar seus perfis. A superfície cuticular dos indivíduos estudados é constituída principalmente por hidrocarbonetos variando de C21 a C33, incluindo alcanos, alcenos e alcanos metilados. Pequena quantidade de compostos oxigenados foi encontrada, principalmente no grupo AC. Os resultados, submetidos à análises estatísticas multivariadas, apontaram variação qualitativa e quantitativa dos compostos presentes, nas fases da vida/ funções das operárias na colônia. O composto mais abundante encontrado em RE e AC é o alcano heptacosano enquanto em FO destaca-se como principal composto o alceno 9-heptacoseno. Além dos compostos que são exclusivos de cada fase da vida e, portanto, separam os grupos pela sua presença ou ausência, também há os compostos que são comuns a todas as fases, mas diferem em quantidade, contribuindo para separar os grupos. Os compostos responsáveis pelas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de operárias são os: alcanos tricosano e hexacosano em RE, Z-octacoseno e noncosano em AC e 11,13-metilpentacosano, Z-hexacoseno e 9-heptacoseno em FO. Quanto às possíveis funções dos compostos, ressalta-se a dos alcenos no reconhecimento das companheiras de ninho, principalmente nas FO ao voltarem da coleta para a colônia. Os resultados são discutidos levando em consideração as tarefas que a operária desempenha. Independente da possível função dos compostos da superfície cuticular, deve ser dito que aceita-se a hipótese formulada.

PALAVRAS-CHAVE: Abelha. Cromatografia em fase gasosa. Hidrocarbonetos. Reconhecimento.

ABSTRACT: The cuticle of the insects is covered by an impermeable layer of waxes whose primary function is the individual's protection against dehydration. However, during the evolution, the cuticle compounds acquired functions in the communication, such as recognition inter and intra-specific, genre, physiologic state and the individual's fertility. The workers of eusocial insects perform several tasks in the colony along the life in a sequence known as etary polietism. In this case, the information supplied in worker's cuticular surface is important not only to discriminate nestmates from non-nestmate but the compounds also allow to identify phases of life or tasks executed by them. The present study aimed to identify the chemical cuticle profile of workers of *Scaptotrigona postica* in different phases of life (newly emerged - RE; working in the combs area - AC; and foragers - FO) by gas chromatography-mass spectrometry GC-MS, and to compare their profiles. The surface chemical profile of studied individuals' is constituted mainly by hydrocarbons from C21 to C33, including alkanes, alkenes and methyl-branched alkanes, although smaller amount of oxygenated compounds has been found, mainly in AC. The results analyzed through multivariate statistical showed qualitative and quantitative variation in relation to the life phases/ task performed in colony. The most abundant compound found in RE and AC is the alkane heptacosane while in FO is the alkene 9-heptacosene. Besides exclusive compounds found at each phase of the life that are responsible to separate the worker groups, there are common compounds to all groups differing significantly in amount, contributing to separation. The compounds responsible for the significant differences among the workers' groups studied are: the alkanes tricosane and hexacosane in RE, Z-octacosene and noncosane in AC and 11,13-methylpentacosane, Z-hexacosene and 9-heptacosene in FO. The probable function of the alkene is nestmate recognition, mainly in FO when the foragers come back from the collection activities to the colony. The results are discussed taking into account the tasks that the workers carry out. However, as conclusion might be said that the initial hypothesis might be accepted.

KEYWORDS: Bee. Gas chromatography. Hydrocarbons. Recognition.

1. INTRODUÇÃO

A cutícula é a parte do tegumento dos insetos que faz a interface entre o organismo e o meio. A sua rigidez é responsável pela função de exoesqueleto e por sua resistência à abrasão. A camada mais externa da cutícula é recoberta por ceras que formam uma camada

impermeável cuja função primária é a proteção contra desidratação (LOCKE, 1964; HACKMAN, 1964; LOCKEY, 1988).

O que é usualmente denominado como cutícula, é uma parte complexa do tegumento constituída por duas camadas de composição química distinta, a cutícula propriamente dita, que confere rigidez à cobertura dos insetos e a epicutícula, depositada sobre esta. A composição da cutícula é variável, mas de maneira simplificada pode dizer-se que é composta principalmente por proteínas e por quitina, um polissacarídeo nitrogenado (CHAPMAN, 1998). A epicutícula é muito fina e eletrônica-densa, embora composta por extratos de composição diferente. O extrato mais externo é composto principalmente por hidrocarbonetos (HOWARD, 1993; NELSON, 1993) que têm a função primária de proteção contra a dessecação. Os hidrocarbonetos cuticulares geralmente compreendem longas cadeias de 20 a 40 átomos de carbono, com três classes estruturais: n-alcenos, n-alcenos e alcanos ramificados (mono, di e tri-metila) (HOWARD, 1993). Os alcanos formam uma camada impermeável, o que dá resistência à dessecação, enquanto os alcenos formam uma camada mais permeável e poderiam estar relacionados à comunicação química (GIBBS, 2002). Além dos hidrocarbonetos podem ser encontrados compostos oxigenados, tais como ácidos, ésteres e alcoóis de cadeia longa (BUCKNER, 1993).

Os hidrocarbonetos cuticulares são particularmente interessantes como sinalizadores no sistema de reconhecimento devido a sua estabilidade química, baixa volatilidade e a uma diversidade de estrutura que permite variabilidade na composição do perfil cuticular (BLOMQUIST et al., 1987; NELSON, 1993). Segundo Dani et al. (2001;2005) os alcenos são mais importantes para o sistema de reconhecimento de companheiros de ninho em *Apis mellifera* que os alcanos enquanto em *Polistes dominulus*, não só os alcenos mas também os alcanos metilados estão relacionados com esse sistema. Portanto, durante o processo evolutivo, os compostos cuticulares passaram a exercer a função de feromônios de contato úteis na comunicação em situações tais como reconhecimento co-específico, do gênero, do estado fisiológico do indivíduo, e no caso dos insetos sociais na discriminação entre companheiros e não companheiros de ninho e reconhecimento de castas, além de fornecer pistas específicas sobre a fase da vida, função ou “status” social do indivíduo como dominância e fertilidade (HOWARD, 1993; CLÉMENT & BAGNÈRES, 1998; SINGER et al., 1998; VANDER MEER & MOREL, 1998; STEINMETZ et al., 2003; HOWARD & BLOMQUIST, 2005).

Nos insetos sociais, cada indivíduo na colônia possui seu próprio perfil de compostos cuticulares, o qual constitui uma assinatura química individual (CARLIN, 1989; LORENZI

et al., 1996). Estudos realizados com meliponíneos foram conduzidos enfatizando as mudanças que ocorrem na constituição do perfil cuticular em operárias, rainhas e machos, ou ainda, entre colônias conspecíficas (ABDALLA et al., 2003; NUNES et al., 2008; FERREIRA-CALIMAN et al., 2010) ou entre diferentes espécies (BUCHWALD & BREED, 2005) tendo como foco correlacionar os compostos de superfície com o reconhecimento de companheiros e não companheiros de ninho.

Deste modo, o presente trabalho teve por finalidade traçar o perfil químico cuticular de operárias recém emergidas, trabalhando na área de cria e forrageiras de *Scaptotrigona postica* qualificando e quantificando os compostos encontrados, fazendo uma correlação do perfil com as atividades desempenhadas pelas operárias na colônia a fim de verificar se sua composição permite separá-las em grupos funcionais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

O perfil químico da superfície cuticular foi analisado através de cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa (CG-EM). Foram analisados pares de asas já que esta parte do corpo contém a mesma constituição química encontrada na superfície do corpo e é menos sujeita a contaminação por superfícies que possam entrar em contato no ninho ou durante as atividades de coleta nas plantas (VOGEL 1963; 1974; CRUZ-LANDIM et al., 1965; OLDHAM et al., 1994) ou, ainda, menos contaminada pela presença de eventuais glândulas tegumentares.

Foram utilizadas asas de operárias de *S. postica* nas seguintes fases da vida: recém emergidas (RE), as quais foram coletadas ao sair do favo de cria; trabalhando na área de cria (AC); e forrageiras (FO), coletadas ao voltarem para a colônia. Os indivíduos que foram coletados pertenciam à mesma colônia, localizada no meliponário da Universidade Estadual Paulista UNESP, Instituto de Biociências de Rio Claro. Utilizaram-se espécimens de uma só colônia porque a intenção foi a de verificar as diferenças que caracterizam o grupo/tarefa desempenhada pelo indivíduo na colônia. Foram utilizados 08 pares de asas de operárias RE e 07 pares de AC e FO para determinação da composição química e 05 operárias inteiras de cada fase para a identificação das posições das insaturações nas moléculas dos hidrocarbonetos.

2.2. Métodos

As análises químicas foram conduzidas no Lennard-Jones Laboratories do Chemical Ecology Group na Keele University, United Kingdom, sob supervisão do Dr. E.D. Moragn e Dr. F.P. Drijfhout. Usou-se um aparelho de cromatografia em fase gasosa (Hewlett-Packard 6890) equipado com uma coluna HP-5MS (30 metros de comprimento, 0.25mm de diâmetro) acoplado diretamente a um Detector de Massas 5973 (Espectrômetro de Massa utilizando ionização por impactação de elétrons -70eV).

2.2.1. Análise do perfil químico da superfície cuticular

Segundo metodologia desenvolvida por Morgan (1990), utilizou-se injeção sólida. Cada par de asas foi dissecado e inserido em um capilar de vidro fino e de fundo cego, medindo aproximadamente 5cm de comprimento. Em seguida, a outra extremidade do capilar foi selada com chama. Os capilares foram inseridos individualmente no interior do cromatógrafo e quebrados para liberação dos compostos e análise dos mesmos.

As amostras foram processadas no modo *splitless*. O protocolo de temperatura utilizado foi: 40°C, mantido por 1 minuto, e aumentada posteriormente até 320°C a uma taxa de 15°C/min., a qual foi mantida por 10 minutos. O gás Hélio foi utilizado como gás carreador a uma taxa constante de 1.0ml/min.

A quantificação foi realizada com base nas áreas dos picos obtidos nos cromatogramas (SINGER & ESPELIE, 1992). Os compostos químicos foram identificados baseados nos seus espectros de massa e por comparação com uma base de dados (MS-Database) e consulta à Biblioteca Wiley.

2.2.2. Identificação das posições das insaturações nos alcenos cuticulares

Para a identificação da posição das ligações duplas nos hidrocarbonetos insaturados foi utilizada a técnica do dimetil dissulfeto (DMDS), seguindo as instruções de Carlson et al. (1989).

Foram utilizados os corpos inteiros de operárias RE, AC e FO. Cinco indivíduos de cada grupo foram postos individualmente em frascos contendo 1ml de hexano (solvente apolar), durante 15 minutos, para extração dos hidrocarbonetos. O extrato foi evaporado utilizando-se N₂ e posteriormente re-suspenso em 200µl de hexano. Logo após, 50µl de uma solução de iodo a 5% em dimetil-éter e 100µl de DMDS foram adicionados ao extrato

re-suspendido. Os frascos foram passados rapidamente por um jato fraco de N₂ e em seguida aquecidos a 55°C *overnight*. Em seguida, uma solução de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃ líquido) foi adicionada na proporção de 1:1 e a fase orgânica sobrenadante separada da fase inorgânica. A fase orgânica foi evaporada com N₂, re-suspendida em 30µl de hexano e 2µl dessa solução foi injetado no CG-EM no modo *splitless*. O protocolo de temperatura usado foi de 50°C, mantida por 2 minutos, aumentando posteriormente até 160 °C a uma taxa de 25°C/min. e subindo novamente para 320°C a uma taxa de 8°C/min permanecendo nesta temperatura por 15 minutos. Foi utilizado Hélio como gás carreador a uma taxa constante de 1.0ml/min e tempo de atraso do solvente de 3 minutos, após o qual o espectrômetro de massa foi ligado.

2.2.3. Análises estatísticas

A análise dos resultados foi feita usando estatística multivariada:

1. Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA): com o objetivo de observar os possíveis agrupamentos de indivíduos, de acordo com as similaridades entre eles, utilizando todas as variáveis disponíveis, no caso, todos os compostos encontrados na superfície cuticular;
2. Análise de Componentes Principais (ACP): com o objetivo de correlacionar as variáveis (compostos) e os grupos de operárias;
3. Análise Discriminante (AD): com o objetivo de verificar se os grupos estão bem discriminados, ou seja, se os indivíduos estão corretamente classificados dentro dos grupos pré-estabelecidos (RE, AC e FO) e identificar quais variáveis são mais importantes para a discriminação entre eles. Para a realização da AD, foram selecionados apenas os compostos comuns a todas os grupos estudados. O programa estatístico utilizado foi o XLSTAT 2011.

3. RESULTADOS

A análise química da superfície cuticular em todos os indivíduos analisados revelou uma mistura de hidrocarbonetos, consistindo principalmente de cadeias com números ímpares de carbono, variando de C21 a C33, incluindo alcanos, alcenos, alcanos metilados e pequena quantidade de outros compostos tais como álcool, cetonas e ésteres (Tabela 1). Os alcanos metilados restringiram-se às cadeias ímpares de carbonos. Para melhor visualização

dos compostos nas análises estatísticas, os mesmos foram denominados por abreviações que os identificam (ID), listados na Tabela 1.

Ao todo, 39 compostos foram encontrados na superfície cuticular de operárias de *S. postica*. Os hidrocarbonetos perfazem 69,23% dos compostos, sendo, portanto, os mais abundantes em todos os grupos analisados (Tabela 1). Observa-se, entretanto, que ocorre variação qualitativa e quantitativa entre os grupos. Compostos comuns a todos os grupos de operárias podem variar quantitativamente conforme a fase ou função desempenhada na colônia (Tabela 1 e Figura 1). Por outro lado, alguns compostos são exclusivos de determinadas fases da vida. Por exemplo, os alcanos heneicosano e docosano são exclusivos das operárias RE, enquanto o álcool X-tetradecanol e o éster hexanoato de etila foram encontrados apenas nas operárias AC. Não foram encontrados compostos exclusivos das operárias FO (Tabela 1).

O grupo RE apresentou 32 compostos na superfície cuticular, dos quais os alcanos heptacosano, tricosano e pentacosano foram os mais abundantes. Estes três compostos juntos contribuem com 59,70% do total de compostos de superfície em RE. Foi encontrada pequena quantidade de ésteres nas análises cuticulares das operárias desta fase (Tabela 1).

O perfil químico da superfície cuticular de AC apresenta um total de 37 compostos. Observa-se que a quantidade dos compostos oxigenados, tais como álcool, cetonas e ésteres, é maior ou exclusiva desta fase de atividade da operária, em comparação com RE e FO. Entretanto, os hidrocarbonetos, assim como em RE, aparecem em maior quantidade e variedade, sendo o alcano heptacosano e os alcenos 9-nonacoseno e 9-heptacoseno os mais abundantes (Tabela I). Estes três compostos são responsáveis por 46,92% da composição do perfil químico da superfície cuticular de AC.

No grupo FO, foram encontrados 35 compostos constituindo o perfil químico da superfície cuticular. Ainda nesta fase, pôde-se notar pequena quantidade de compostos oxigenados, como cetonas e ésteres, porém, como nos demais grupos analisados, os hidrocarbonetos predominam em quantidade e variedade. Observou-se que os hidrocarbonetos 9-heptacoseno, pentacosano e 9-nonacoseno são os principais compostos, contribuindo com 70,74% dos compostos (Tabela 1).

Os cromatogramas dos perfis químicos da superfície cuticular de RE, AC e FO mostrados na Figura 1 permitem, através da variação da altura dos picos, observar como se comportam os principais compostos encontrados em cada um dos grupos de operárias.

As reações com DMDS revelaram que a posição da ligação dupla é a mesma nos diferentes alcenos: 9-heptacoseno, 9-nonacoseno e 9-hentriaconteno. Não foi possível

identificar a posição da dupla ligação nos demais alcenos encontrados na superfície cuticular das operárias estudadas devido à pequena quantidade dos mesmos nas amostras. A Figura 2 exemplifica, com o 9-heptacoseno, como os espectros de massa se apresentam antes e depois da reação com DMDS.

Tabela 1. Porcentagem média e desvio padrão (DP) da concentração relativa (%) dos compostos encontrados na superfície cuticular de operárias de *Scaptotrigona postica* em diferentes fases da vida. (ID = identificação do composto; TR = tempo de retenção; RE = operárias recém emergidas; AC = operárias trabalhando na área de cria; FO = operárias forrageiras). Os compostos que apresentaram concentração relativa abaixo de 0.05% foram tratados como traços (*t*).

ID	TR	Compostos	RE (n=8) Média ± DP	AC (n=7) Média ± DP	FO (n=7) Média ± DP
Álcool					
A1	11.157	X-Tetradecanol	-	1.09 ± 0.39	-
Cetonas					
C2	9.703	2-Tridecanona	-	5.01 ± 3.42	<i>t</i>
C3	11.260	2-Pentadecanona	-	2.37 ± 1.21	0.25 ± 0.03
Ésteres					
E4	13.017	Hexanoato de etila	-	0.83 ± 0.70	-
E5	14.064	Linoneato de etila	-	2.34 ± 1.89	<i>t</i>
E6	14.071	Oleato de etila	3.61 ± 1.42	4.48 ± 3.61	<i>t</i>
E7	19.850	Hexanoato de hexadecila	0.22 ± 0.15	0.43 ± 0.43	0.44 ± 0.32
E8	19.134	Mistura de hexanoato de tetradecila e tetradecanoato de hexadecila	0.36 ± 0.17	0.70 ± 1.13	0.34 ± 0.27
E9	19.954	Mistura de hexadecanoato de hexadecila e tetradecanoato de octadecila	0.37 ± 0.31	0.45 ± 0.39	0.33 ± 0.28
Hidrocarbonetos					
H10	13.547	Heneicosano (C21)	0.58 ± 0.26	-	-
H11	14.160	Docosano (C22)	0.45 ± 0.24	-	-
H12	14.711	Z-Tricoseno	-	1.00 ± 1.71	0.42 ± 0.28
H13	14.766	Tricosano (C23)	20.42 ± 7.71	1.31 ± 0.55	1.72 ± 2.18
H14	15.318	Tetracosano (C24)	1.05 ± 0.29	0.64 ± 0.84	0.75 ± 0.93
H15	15.696	Z-Pentacoseno	0.29 ± 0.19	0.96 ± 0.27	3.87 ± 3.70
H16	15.862	Pentacosano (C25)	17.65 ± 2.21	6.59 ± 1.51	17.70 ± 5.84
H17	16.006	11, 13-Metilpentacosano	0.20 ± 0.06	0.50 ± 0.07	0.81 ± 0.21
H18	16.096	5-Metilpentacosano	0.45 ± 0.12	0.60 ± 0.14	0.43 ± 0.17
H19	16.254	Z-Hexacoseno	0.33 ± 0.11	0.93 ± 0.29	1.80 ± 0.42
H20	16.365	Hexacosano (C26)	1.63 ± 0.40	1.04 ± 0.31	0.50 ± 0.13
H21	16.743	9-Heptacoseno	4.75 ± 1.57	13.16 ± 2.02	43.81 ± 8.60

H22	16.874	Heptacosano (C27)	21.73 ± 6.06	20.01 ± 4.23	8.26 ± 1.58
H23	17.012	11, 13-Metilheptacosano	1.00 ± 0.26	1.12 ± 0.11	0.63 ± 0.39
H24	17.102	5-Metilheptacosano	0.32 ± 0.08	0.52 ± 0.06	0.20 ± 0.06
H25	17.233	Z-Octacoseno	0.83 ± 0.18	1.66 ± 0.19	0.77 ± 0.25
H26	17.722	9-Nonacoseno	13.70 ± 1.47	13.75 ± 4.15	9.23 ± 2.62
H27	17.818	Nonacosano (C29)	6.96 ± 2.95	13.11 ± 3.55	3.11 ± 1.15
H28	17.942	13, 15-Metilnonacosano	0.77 ± 0.12	0.71 ± 0.16	0.91 ± 1.58
H29	18.039	5-Metilnonacosano	0.32 ± 0.10	0.38 ± 0.08	0.15 ± 0.05
H30	18.163	Z-Triaconteno	0.44 ± 0.10	0.77 ± 0.09	0.36 ± 0.12
H31	18.273	Triacontano (C30)	0.38 ± 0.22	0.25 ± 0.11	0.16 ± 0.16
H32	18.617	9-Hentriaconteno	1.70 ± 0.28	1.40 ± 0.32	4.01 ± 1.84
H33	18.714	Hentriacontano (C31)	0.86 ± 0.28	0.99 ± 0.28	1.09 ± 0.83
H34	18.824	11, 15-Metilhentriacontano	0.31 ± 0.06	0.27 ± 0.07	0.21 ± 0.10
H35	19.471	Z-Tritriaconteno	0.18 ± 0.07	0.23 ± 0.15	0.94 ± 0.56
H36	19.554	Tritricontano (C33)	0.19 ± 0.16	0.20 ± 0.09	0.56 ± 0.47
Não identificados					
H37	18.941	ND1	0.21 ± 0.12	0.53 ± 0.28	<i>t</i>
H38	19.024	ND2	0.14 ± 0.06	0.57 ± 0.71	0.22 ± 0.07
H39	19.768	ND3	-	0.24 ± 0.08	0.33 ± 0.21

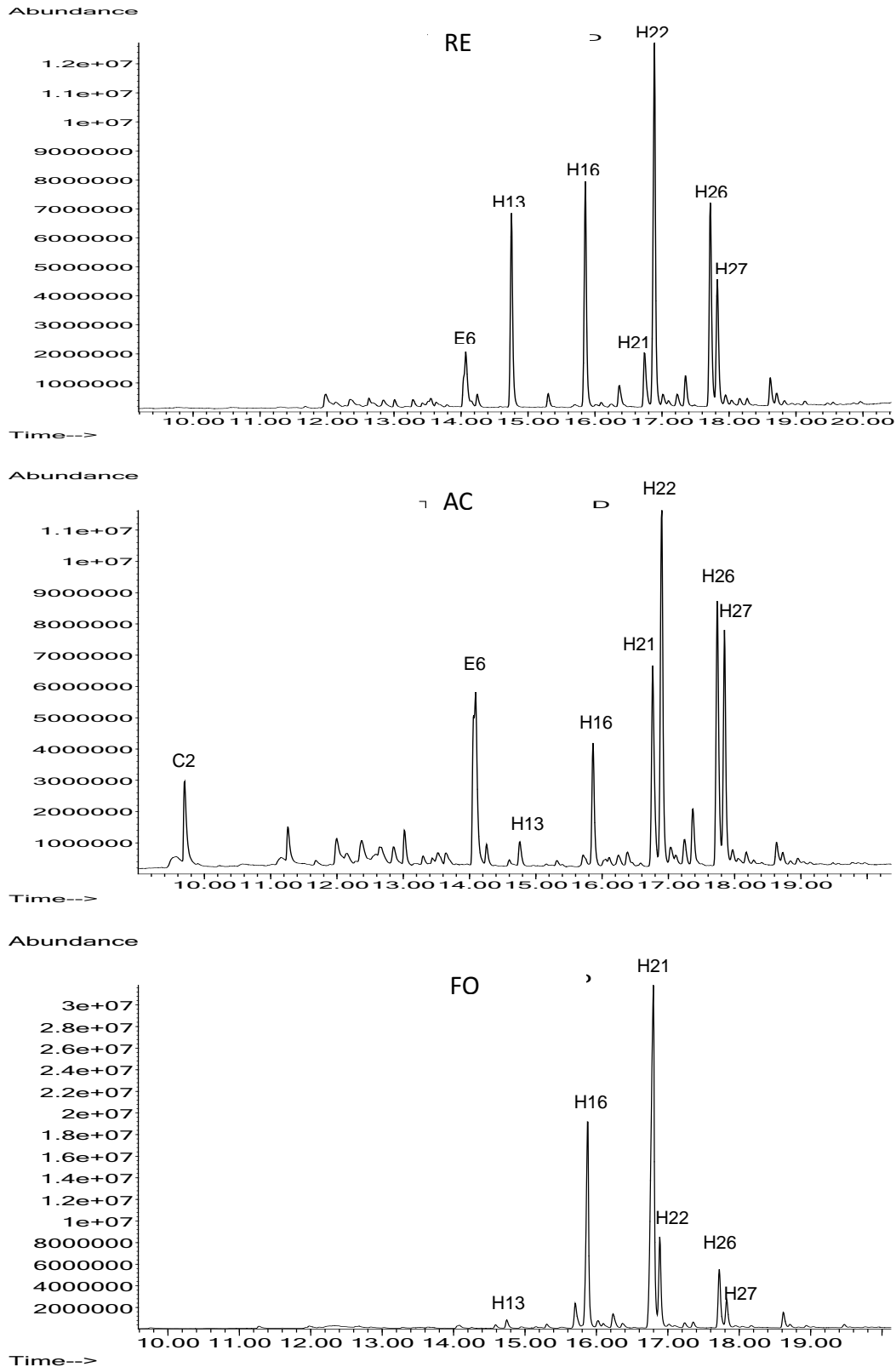
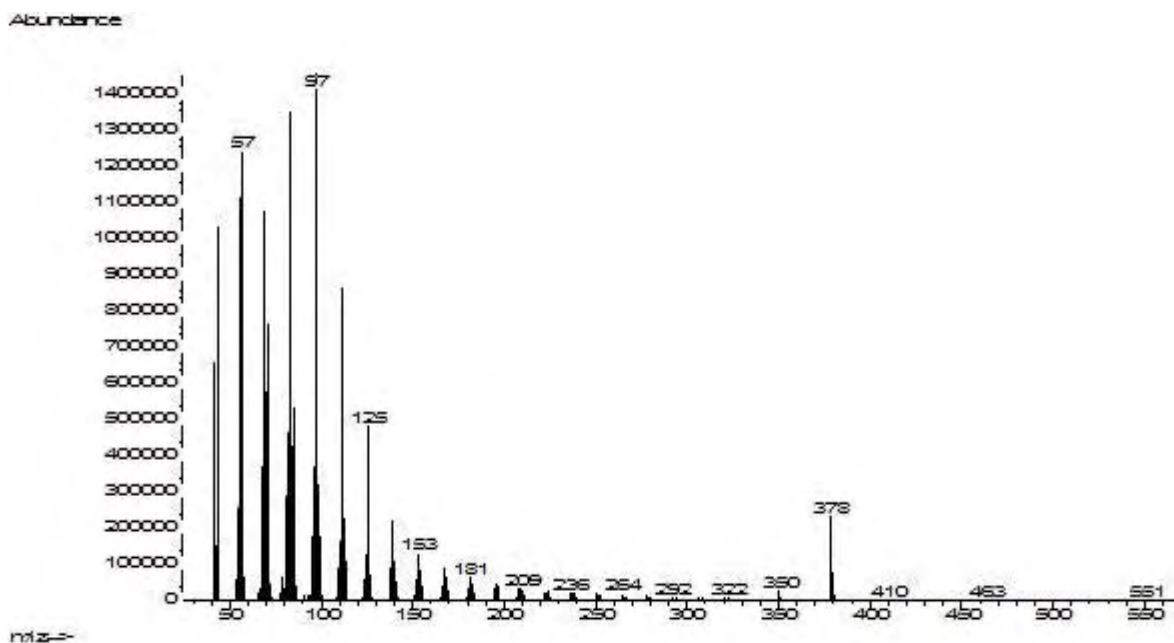


Figura 1. Cromatogramas dos perfis químicos da superfície cuticular de operárias recém emergidas (RE), trabalhando na área de cria (AC) e forrageiras (FO) de *Scaptotrigona postica*. Apenas os principais compostos estão marcados baseando-se na listagem dos picos na Tabela 1. Notar a variação na altura dos picos comuns às três fases analisadas, indicando diferentes quantidades do composto.

A



B

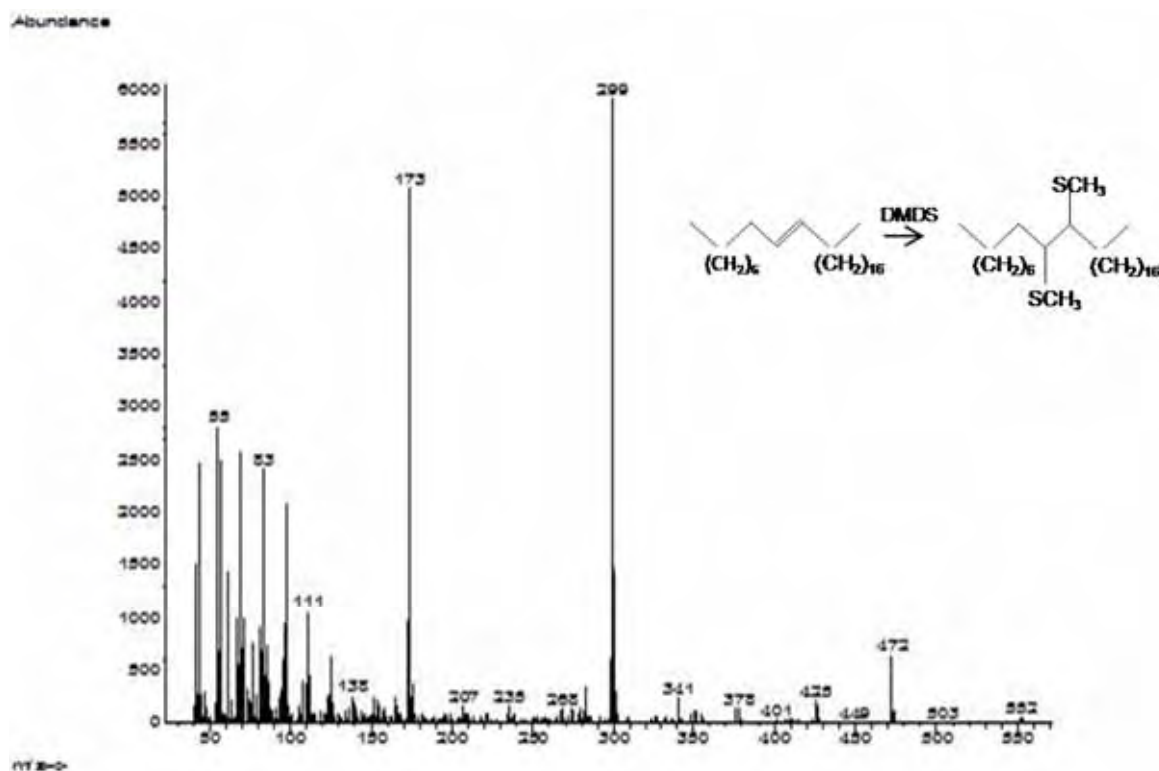


Figura 2. Reação de derivação com dimetil dissulfeto (DMDS) em cutícula de operária de *Scaptotrigona postica*. Espectros de massa do alcano heptacosano (A) e do alceno 9-heptacoseno (B). Inserção dos radicais -SCH_3 na posição da insaturação revelaram a posição da dupla ligação no carbono 9, através das análises dos picos 173 e 299.

O dendrograma resultante da AHA mostrou que existem 3 grupos principais os quais são formados por indivíduos que apresentam similaridades entre si em relação aos compostos da superfície cuticular (Figura 3). No grupo AC foi verificada a presença de uma operária RE (RE8), enquanto o grupo FO contém um dos indivíduos AC (AC1).

A ACP não só dividiu as operárias em 3 grupos, corroborando o resultado obtido na AHA, como também correlacionou os grupos das operárias com as variáveis (compostos da superfície cuticular). As 3 primeiras componentes principais F1, F2 e F3 geradas pela ACP explicam 64,89% da variabilidade das amostras e o gráfico *biplot* da componente principal 1 (F1) *versus* a componente principal 2 (F2) é mostrado na Figura 4. Observa-se que o indivíduo AC1 encontra-se afastado de seu grupo AC, porém com tendência para o grupo FO, como também mostrou o dendrograma da AHA.

Como, com estas análises (AHA e ACP) não se tem informação sobre os pesos significativos das variáveis para determinar os agrupamentos, a AD foi realizada com a finalidade de verificar se os indivíduos representam adequadamente as funções a que foram pré-determinados no momento da coleta e identificar as variáveis que são mais importantes para discriminação entre eles. Para tanto, apenas os compostos comuns a todos os grupos podem ser comparados. Segundo a Tabela 1, verifica-se que 30 compostos são comuns a todos os grupos de operárias: os ésteres de E6 a E9 e os hidrocarbonetos de H13 a H38. Deste modo a AD foi feita com estes compostos selecionados e o teste de Lambda de Wilks (Tabela 2) revelou através dos valores do F observado e do F crítico que há diferença significativa entre os grupos ($F_{obs} > F_{cr}$). A distância de Fisher entre todos os grupos foi $p < 0.0001$, isto é, todos os grupos diferem entre si. Embora todos os grupos difiram entre si, a distância de Mahalanobis revelou que o grupo RE e AC possuem perfis químicos cuticulares mais semelhantes entre si por serem grupos mais próximos (menor distância) enquanto RE e FO, por estarem mais distantes entre si, possuem perfis químicos mais distintos (Tabela 3 e Figura 5). O gráfico das observações (F1 versus F2) da AD segregou completamente os 3 grupos RE, AC e FO (Figura 5).

Dentre os 30 compostos analisados, 8 são os responsáveis pela separação e distinção entre os grupos, dados pelos valores de $p < 0,0001$ na Tabela 4. Verifica-se que os compostos H13 (tricosano) e H20 (hexacosano) determinam o grupo RE; H25 (Z-octacoseno) e H27 (nonacosano) determinam o grupo AC; H17 (11,13-metilpentacosano), H19 (Z-hexacoseno) e H21 (9-heptacoseno) distinguem FO dos demais grupos; e H22 (heptacosano) separa RE e AC das FO (Figura 5 e 6). Os indivíduos apresentaram 100% de alocação correta nos grupos

pré-estabelecidos, conseqüentemente, nas funções que estão desempenhando quando da coleta.

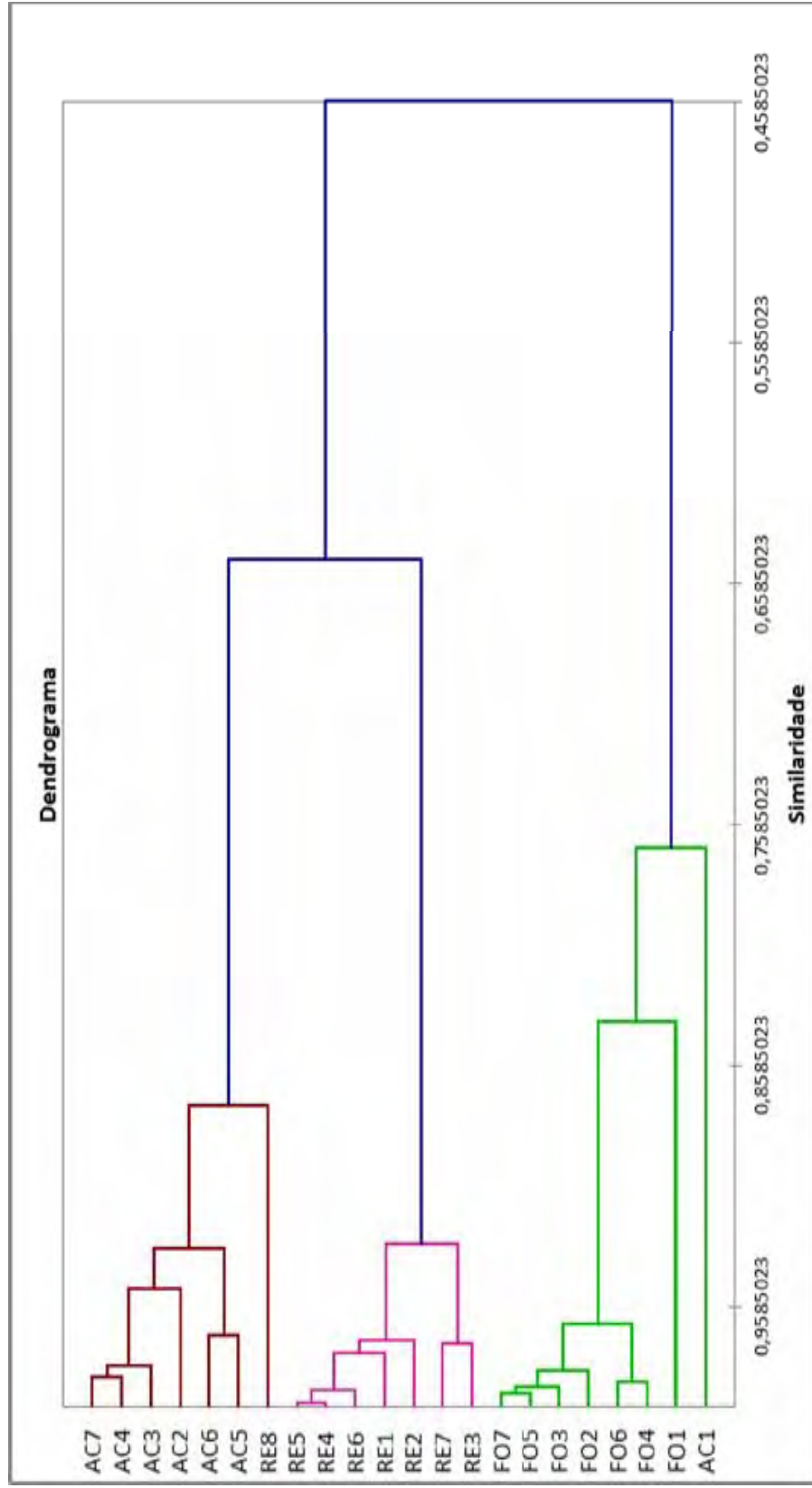


Figura 3. Através da análise AHA, observou-se que as operárias formam 3 grupos e, com exceção de 2 indivíduos, RE8 e AC1, todos os demais estudados fazem parte dos grupos pré-estabelecidos.

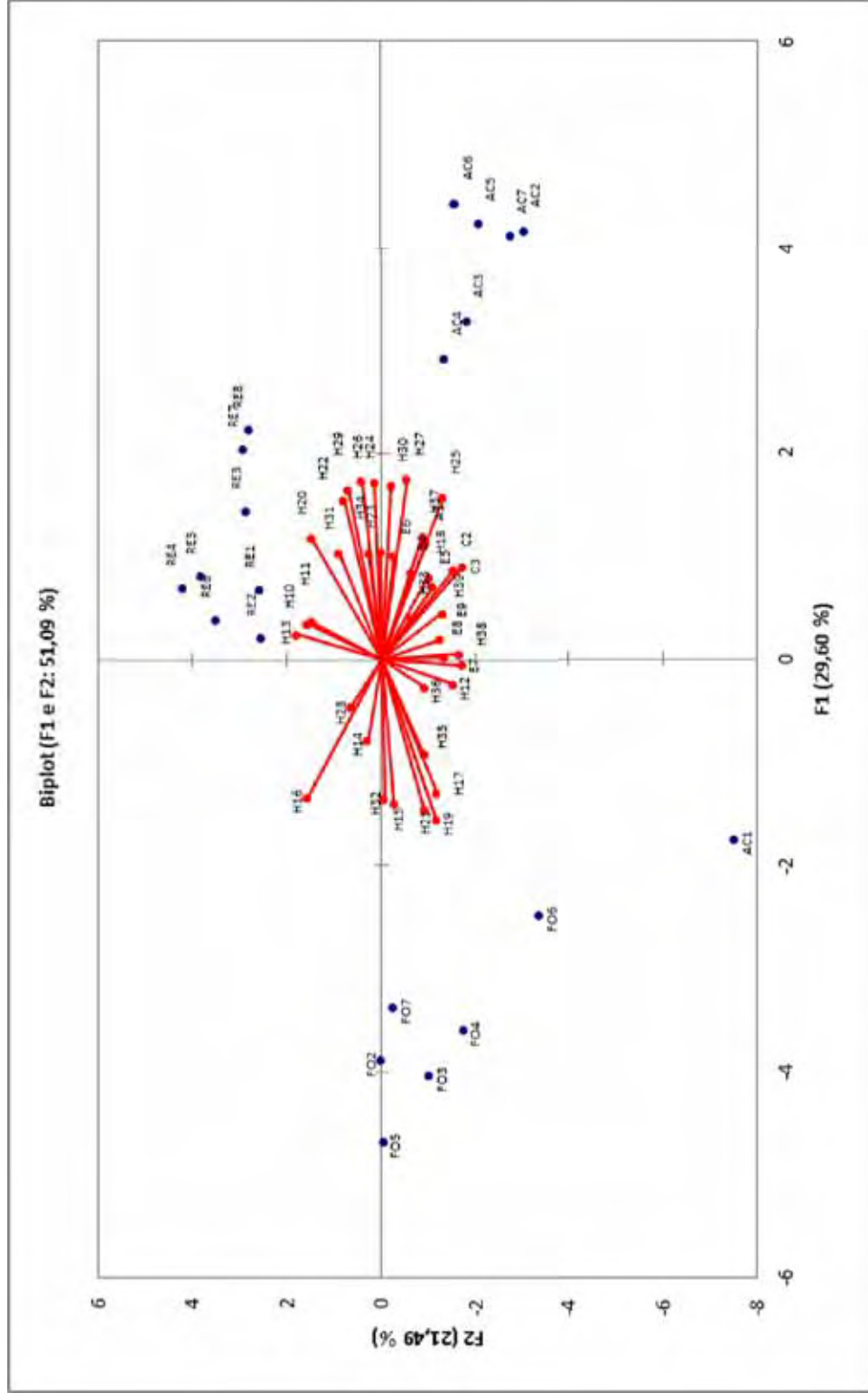


Figura 4. Gráfico resultante da ACP, onde as componentes principais F1 e F2 explicam 51,09% da variabilidade no sistema (das amostras). Três grupos são distinguidos: FO, RE e AC, sendo que AC1 aparece um pouco deslocado de seu grupo.

Tabela 2. Teste do Lambda de Wilks (aproximação de Rao). O valor de F observado é maior que o de F crítico, indicando que os grupos diferem entre si.

Lambda	0,000
F (valor observado)	25491,790
F (valor crítico)	19,469
DF1	38
DF2	2
p-value	< 0,0001
alpha	0,05

Tabela 3. Distância de Mahalanobis indicando que o grupo RE e AC são mais próximos entre si que o grupo FO e que a maior distância ocorre entre RE e FO, ou seja, o perfil químico cuticular é mais semelhante entre RE e AC e mais distinto entre RE e FO.

	AC	FO	RE
AC	0	493,768	201,040
FO	493,768	0	740,812
RE	201,040	740,812	0

Tabela 4. Teste unidimensional de igualdade das médias das variáveis. As variáveis com $p < 0,0001$ indicam diferenças significativas entre os grupos.

Variáveis	Lambda	F	DF1	DF2	p-value
E6	0,693	4,205	2	19	0,031
H13	0,194	39,388	2	19	< 0,0001
H14	0,936	0,648	2	19	0,534
H15	0,601	6,317	2	19	0,008
H16			2	19	
H17	0,188	40,959	2	19	< 0,0001
H18	0,725	3,609	2	19	0,047
H19	0,170	46,446	2	19	< 0,0001
H20	0,339	18,488	2	19	< 0,0001
H21	0,073	120,425	2	19	< 0,0001
H22	0,328	19,446	2	19	< 0,0001
H23			2	19	
H24			2	19	
H25	0,239	30,328	2	19	< 0,0001
H26	0,584	6,766	2	19	0,006
H27	0,281	24,268	2	19	< 0,0001
H28			2	19	
H29	0,405	13,957	2	19	0,000
H30			2	19	
H31			2	19	
H32	0,425	12,842	2	19	0,000
H33			2	19	
H34	0,919	0,833	2	19	0,450
H35	0,561	7,442	2	19	0,004
H36			2	19	
H37	0,446	11,783	2	19	0,000
H38	0,747	3,226	2	19	0,062
E7			2	19	
E8			2	19	
E9			2	19	

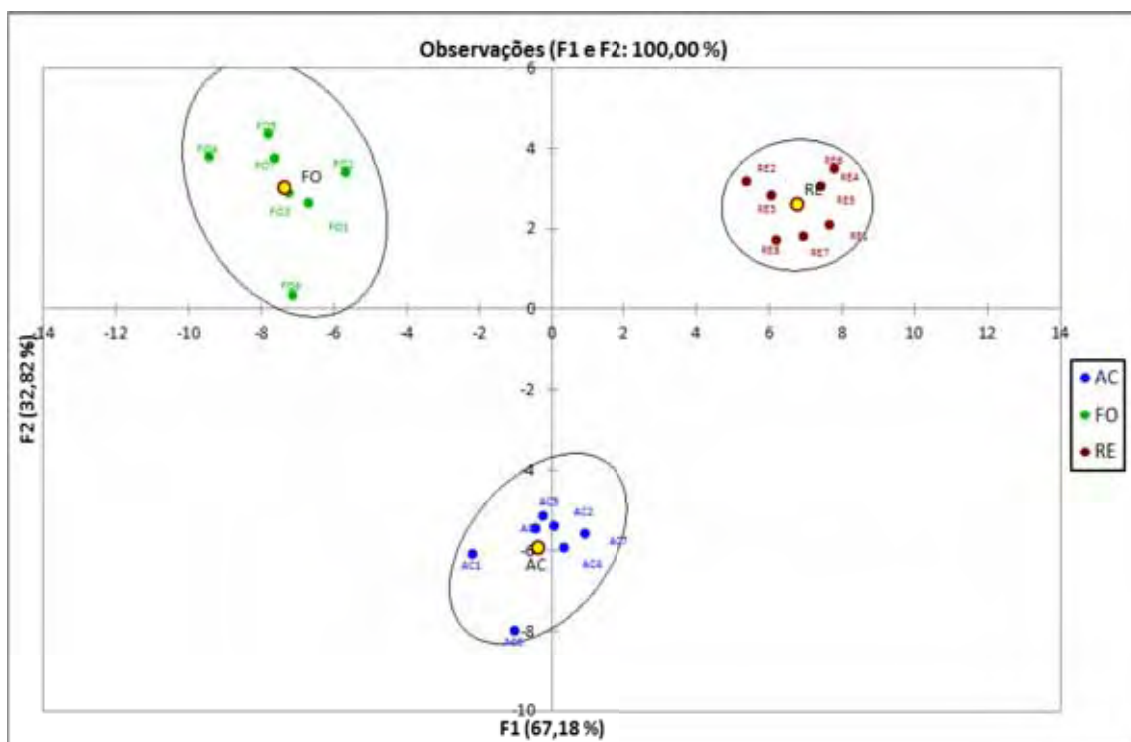


Figura 5. Gráfico resultante da análise discriminante (AD). Os indivíduos estudados apresentaram 100% de alocação correta ($F1 + F2 = 100\%$). RE = recém emergidas; AC = trabalhando na área de cria; FO = forrageiras.

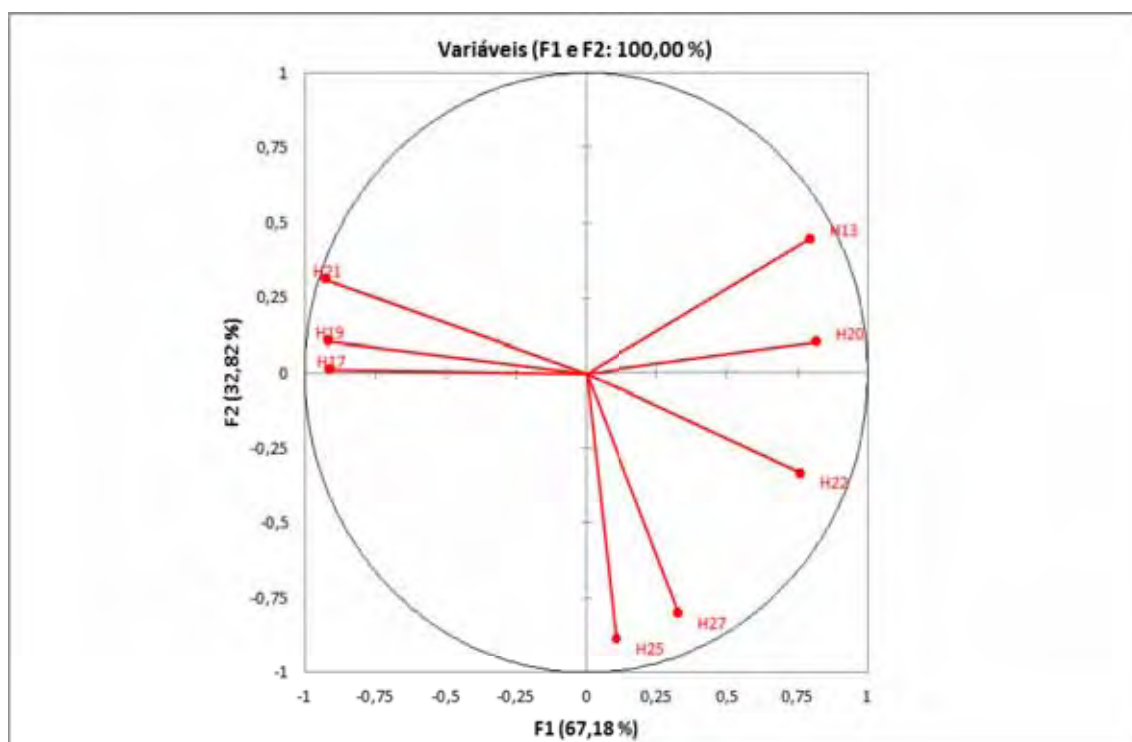


Figura 6. Gráfico resultante da análise discriminante (AD) mostrando a correlação entre as variáveis e quais delas são mais representativas e determinam cada função das operárias.

4. DISCUSSÃO

Sabe-se que em Euglossinae (VOGEL 1963; 1974; CRUZ-LANDIM et al., 1965) e em algumas espécies de *Bombus* (OLDHAM et al., 1994) as operárias carregam em seus corpos, principalmente nas pernas, compostos de plantas e de seus ninhos que podem contaminar e influenciar os resultados da análise química do perfil cuticular. A parte menos sujeita a contaminantes são as asas, as quais contêm a mesma mistura de hidrocarbonetos encontrada na superfície do corpo. Deste modo, as asas foram usadas para traçar o perfil químico cuticular.

Os resultados mostram que o perfil químico da superfície cuticular das operárias de *S. postica* varia de acordo com a função exercida, fato dos mais importantes para manter a homeostase da colônia por permitir o pronto reconhecimento do *status* social do indivíduo. Neste contexto, a distinção entre os grupos de operárias é dada pela presença de compostos exclusivos do grupo, como por exemplo, do álcool X-tetradecanol em AC ou pelas diferenças quantitativas estatisticamente significantes dos compostos que são comuns a todas as fases.

Nos insetos, os lipídios cuticulares mais comuns são os hidrocarbonetos (JACKSON & BLOMQUIST, 1976; NELSON, 1978; BLOMQUIST & DILLWITH, 1985; BLOMQUIST & JACKSON, 1979; HOWARD & BLOMQUIST, 1982; LOCKEY, 1980, 1985) e segundo Morgan (2004), variam de C17 a C49, compreendendo alcanos, alcanos metilados e alcenos. Entre as espécies de abelhas no que diz respeito aos hidrocarbonetos constituintes do seu perfil cuticular, em *Melipona bicolor*, Abdalla et al. (2003) identificaram alcanos, alcenos e alcanos com ramificações metila, dimetila e trimetila, com cadeias variando de C21 a C32. Nunes et al. (2010) encontraram compondo o perfil cuticular de *Friesella schrottkyi* alcanos, alcenos, alcadienos e alcanos com ramificações metila e dimetila, cujas cadeias variaram de C21 a C35. Também no meliponíneo *Melipona marginata* o perfil cuticular é constituído por hidrocarbonetos abrangendo alcanos, alcenos e alcadienos com cadeias variando de C21 a C31 (FERREIRA-CALIMAN et al., 2010).

A superfície cuticular das operárias da espécie estudada contém também, além de hidrocarbonetos incluindo alcanos, alcanos metilados e alcenos, cujas cadeias variam de C21 a C33, os quais são predominantes em todos os grupos de operárias analisados (RE, AC e FO), alcoóis, cetonas e ésteres. Os compostos oxigenados, principalmente ésteres, estão mais presentes nas operárias AC.

A presença de compostos oxigenados tem sido descrita para várias espécies de insetos (BUCKNER, 1993) e em algumas espécies de abelhas (ABDALLA et al., 2003; NUNES et

al., 2010; Capítulo 4.2 desta tese). Diante do exposto acima, conclui-se que os resultados obtidos para as operárias de *S. postica*, de um modo geral, corroboram os dados das pesquisadas anteriores.

A variação dos compostos na superfície cuticular das operárias de uma fase de atividade para outra foi tanto qualitativa como quantitativa, sendo que operárias RE, que foram coletadas ao emergirem da célula de cria e, portanto, ainda não estavam desempenhando nenhuma tarefa na colônia, apresentaram não só menor variedade de compostos como quantidade menor destes em relação às demais fases analisadas. Tanto os indivíduos que estão executando tarefas na região do favo (AC), seja construindo, aprovisionando os favos de cria, fechando favos após postura da rainha, ou elas mesmas fazendo postura, quanto os indivíduos em atividades de coleta, ou forrageiras (FO), apresentaram maior variedade e quantidade de compostos que a fase RE. Ainda assim, entre as operárias AC e FO, as AC apresentaram 2 compostos a mais que FO, o X-tetradecanol e o hexanoato de etila. Além disso, estas mesmas operárias apresentaram mais compostos oxigenados na superfície cuticular do que as operárias RE e FO. Segundo os resultados estatísticos, ainda que AC e FO possuam maior quantidade de compostos, o grupo RE é mais próximo quimicamente de AC.

Pressupõe-se que os compostos presentes na cutícula das operárias RE sejam aqueles determinados geneticamente, contudo, durante a vida do indivíduo compostos de outra origem podem ser adicionados e outros compostos podem deixar de ser produzidos (FERREIRA-CALIMAN et al., 2010). Alguns dos modos de aquisição de compostos de superfície incluem contato do indivíduo com o alimento estocado na colônia (*Formica*: LANGE, 1960; *Solenopsis invicta*: OBIN & VANDER MEER, 1988; *Linepithema humile*: LIANG & SILVERMAN, 2000) ou ainda, contato com o material utilizado na construção do ninho (*Bombus*: FREE, 1961; *Pogonomirex badius*: HANGARTNER et al., 1970; *Solenopsis invicta*: HUBBARD, 1974; *Polistes*: GAMBOA, 1996; *A. mellífera*: BREED et al., 1995).

A presença de maior quantidade de compostos oxigenados na superfície cuticular de operárias AC pode dever-se ao fato destas estarem em maior contato com a cera do ninho, executando as tarefas relacionadas a esta fase da vida. A cera de alguns meliponíneos contém hidrocarbonetos, monoésteres, ácidos graxos livres, álcoois primários e material polar não identificado (BLOMQUIST et al., 1985). Entretanto, um estudo detalhado da cera de *S. postica* é necessário para confirmar se estes compostos oxigenados encontrados na superfície cuticular de operárias AC provêm da cera.

A proporção de cada um destes compostos (alcanos, alcenos e alcanos metilados) é característica da espécie ou grupo, tornando possível a distinção entre um grupo e outro e, no

caso dos insetos sociais, companheiros de ninho e não companheiros (MORGAN, 2004). Pode ocorrer ainda variação dentro dos grupos de acordo com a idade, casta ou gênero dos indivíduos (BLOMQUIST et al., 1998; MONNIN & PEETERS, 1999; SLEDGE et al., 2001). As análises estatísticas multivariadas AHA, ACP e AD realizadas em conjunto forneceram resultados suficientes para poder afirmar que a superfície cuticular das operárias sofre mudanças químicas significativas ao decorrer da vida, e pode servir na colônia para comunicar aos demais componentes esse status ou para que os demais companheiros o reconheçam.

Apesar de 39 compostos terem sido encontrados na superfície cuticular das operárias de *S. postica*, poucos foram responsáveis pela distinção entre os grupos. Os compostos que não influenciam na distinção entre os grupos são os compostos estruturais da epicutícula. Os alcanos conferem rigidez à camada cuticular enquanto os alcenos, por possuírem menor ponto de fusão, perfazem a parte flexível da cutícula e, segundo Gibbs (2002) são mais acessíveis aos receptores químicos. Então, poucos compostos seriam responsáveis por informações relevantes, na diferenciação dos indivíduos.

O 9-heptacoseno presente na superfície cuticular de FO não só é o composto mais abundante nessa fase da vida da operária como é um dos compostos que distingue este grupo dos demais (RE e AC). O alceno *Z*-hexacoseno e o alceno ramificado 11,13-metilpentacosano são os outros 2 compostos responsáveis pela segregação de FO dos demais grupos. Estes resultados conferem com o que se sabe a respeito de *A. mellifera* quanto aos alcenos serem mais importantes no sistema de reconhecimento que os alcanos (DANI et al., 2005) e em *Polistes dominulus*, em que não só os alcenos mas também os metil alcanos estão relacionados com o sistema de reconhecimento de companheiros de ninho (DANI et al., 2001). Abdalla et al. (2003) também apontam os alcenos como principais hidrocarbonetos cuticulares em *M. bicolor*. No entanto, isso não é uma constante para as espécies. Estudos, apontaram os alcanos como principais constituintes cuticulares em *Scaptotrigona bipunctata* (JUNGNICKEL et al., 2004), *Melipona scutellaris* e *Melipona rufiventris* (PIANARO et al., 2007), *Frieseomelitta varia* e *Lestrimelitta limao* (NUNES et al., 2008) e *Schwarziana quadripunctata* (NUNES et al., 2009) sem, entretanto, verificarem se a função dos alcanos é a de reconhecimento.

Os resultados presentes mostram a presença marcante de alcenos nas FO, tornando estes compostos candidatos à composição do sistema de reconhecimento de companheiras de ninho quando do retorno da à colônia após coleta de material, entretanto, bioensaios serão necessários para confirmação desta hipótese.

Os presentes resultados mostram que a cutícula das operárias de *S. postica* passa por alterações químicas que caracterizam *status* coloniais diferentes, ou seja, sinalizam o desempenho de diferentes tarefas. No caso das FO cuja função as leva a sair do ninho, nota-se aumento gradual na quantia de alcenos entre os compostos cuticulares, marcando a transição das atividades intra para extra-coloniais. A variação na qualidade dos compostos entre os grupos de operárias sugere que embora alguns deles possam ser adquiridos no contato ou com a ingestão de materiais da colônia, a maioria deve ser sintetizada e incorporada à cutícula no processo da aquisição de competência para as tarefas que caracterizam a divisão de trabalho entre as operárias, confirmando a hipótese formulada. Sabe-se que a fonte primária das chamadas ceras cuticulares são os enócitos e provavelmente também, nos imaturos, as próprias células epidérmicas (KRAMER & WIGGLESWORTH, 1950; WIGGLESWORTH, 1965, 1970; DELH, 1973, 1975; CHINO, 1985; GU et al., 1995) mas, os mecanismos de sua incorporação à cutícula permanecem não esclarecidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, F.C.; JONES, G.R.; MORGAN, E.D. & CRUZ-LANDIM, C. Comparative study of the cuticular hydrocarbons composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. **Genet. Mol. Res.**, v.2, p.191-199, 2003.
- BLOMQUIST, G.J. & DILLWITH, J.W. Cuticular lipids. In: Kerkut, G.A. & Gilbert L. I. (Eds.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, 1st.ed., Pergamon Press, Oxford. 1985, pp. 117-154.
- BLOMQUIST, G.J. & JACKSON L.L. Chemistry and biochemistry of insect waxes. **Prog, Lipid Res.**, v.17, p.319-345, 1979.
- BLOMQUIST, G.J.; ROUBICK, D.W. & BUCHMANN, S.L. Wax chemistry of two stingless bees of the *Trigonisca* group (Apidae, Meliponinae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.82B, p.137-142, 1985.
- BLOMQUIST, G.J.; NELSON, D.R. & DE RENOBABLES, M. Chemistry, biochemistry and physiology of insect cuticular lipids. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.6, p.227-265, 1987.
- BLOMQUIST, G.J.; TILLMAN, J.A.; MPURU, S. & SEYBOLD, S.J. The cuticle and cuticular hydrocarbons of insects: structure, function and biochemistry. In: VANDER MEER, R.K.; BREED, M.D.; WINSTON, M.L. & ESPELIE, E.K. (Eds.). **Pheromone communication in social insects**. Westview, Boulder, 1998, pp.35-54.
- BREED, M.D.; GARRY, M.F.; PEARCE, A.N.; HIBBARD, B.E.; BJOSTAD, L.B. & PAGE, R.E., JR. The role of wax comb in honey bee nestmate recognition. **Animal behavior**, 50:489-496, 1995.

- BUCHWALD, R. & BREED, M.D. Nestmate recognition cues in a stingless bee, *Trigona fulviventris*. **Animal Behaviour**, v.70, n.6, p.1331-1337, 2005.
- BUCKNER, J.L. Cuticular polar lipids in insects. In: Stanley-Samuelson, D.W. & Nelson, D.R. (Eds.). **Insect lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology**. Lincoln: Nebraska University of Nebraska Press. 1993, pp.227-270.
- CARLIN, N.F. Discrimination between and within colonies of social insects: two null hypotheses. **Netherlands Journal of Zoology**, v.39, p.86-100, 1989.
- CARLSON, D.A.; ROAN, C.S.; YOST, R.A. & HECTOR, J. Dimethyl disulfide derivatives of long-chain alkenes, alkadienes, and alkatrienes for gas-chromatography mass-spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.61, p.1564-1571, 1989.
- CHAPMAN, R.F. **The Insects: Structure and Function**. Cambridge University Press. 1998, 770p.
- CHINO, H. Lipid transport: biochemistry of hemolymph lipophorin. In: KERKUT, G.A. & GILBERT, L.I. (Eds.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. v.10. Oxford Pergamon Press. 1985, pp.115-135.
- CLÉMENT, J-L. & BAGNÈRES, A.G. Nestmate recognition in termites. In: VANDER MEER, R.K.; BREED, M.D.; WINSTON, M.L. & ESPELIE, E.K. (Eds.). **Pheromone communication in social insects**. Westview, Boulder, 1998, pp.57-58.
- CRUZ-LANDIM, C.; STORT, A.C.; CRUZ, M.A.C. & KITAJLMA, E.W. Órgão tibial dos machos de Euglossini. Estudo ao microscópio óptico e eletrônico. **Rev. Bras. Biol.**, v.25, n.4, p.323-342, 1965.
- DANI, F.R.; JONES, G.R.; CORSI, S.; BEARD, R.; PRADELLA, D. & TURILLAZZI, S. Nestmate recognition cues in the honey bee: differential importance of cuticular alkanes and alkenes. **Chemical Senses**, v.30, p.477-489, 2005.
- DANI, F.R.; JONES, G.R.; DESTRI, S.; SPENCER, S.H. & TURILLAZI, S. Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. **Anim. Behav.**, v.62, p.165-171, 2001.
- DIELH, P.A. Paraffin synthesis in the oenocytes of the desert locust. **Nature**, v.243, p.468-470, 1973.
- DIEHL, P.A. Synthesis and release of hydrocarbons by the oenocytes of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **J. Insect Physiol.**, v.21, p.1237-1246, 1975.
- FERREIRA-CALIMAN, J.M.; NASCIMENTO, F.S.; TURATTI, I.C.; MATEUS, S.; LOPES, N.P. & ZUCCHI, R. The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. **Journal of Insect Physiology**, v.56, p.800-804, 2010.
- FREE, J.B. **The social organization of the bumblebee colony**. Fleet, Hants, UK.: The Central Association of Bee-Keepers. 1961.

- GAMBOA, J.G.; GRUDZIEN, T.A.; ESPELIE, K.E. & BURR, E.A. Kin recognition in social wasps: combining chemical and behavioural evidence. **Animal Behaviour**, v.51, p.625-629, 1996.
- GIBBS, A. Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. **J. Insect Physiol.**, v.48, p.391-400, 2002.
- GU, X.; QUILICI, D.; JUAREZ, P.; BLOMQUIST, G.J. & SCHAL, C. Biosynthesis of hydrocarbons and contact sex pheromone and their transport by lipophorin in females of German cockroach (*Blattella germanica*). **J. Insect Physiol.**, v.41, p.257-267, 1995.
- HACKMAN, R.H. Chemistry of the insect cuticle. In: ROCKSTEIN, M. (Ed). **The Physiology of Insecta**, vol III. New York and London: Academic Press, 1964, pp.379-470.
- HANGARTNER, W.; REICHSON, J.M. & WILSON, E.O. Orientation to nest material by the ant, *Pogonomyrmex badius* (Latreille). **Animal Behaviour**, v.18, p.331-334, 1970.
- HOWARD, R.W. Cuticular hydrocarbons and chemical communication. In: STANLEY-SAMUELSON, D.W. & NELSON, D.R. (Eds). **Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology**. University of Nebraska Press, Lincoln, 1993, pp.179-226.
- HOWARD, R.W. & BLOMQUIST, G.J. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. **Annual review of entomology**, v.50, p.371-393, 2005.
- HUBBARD, M.D. Influence of the nest material and colony odour on digging in the ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, v.9, p.127-132, 1974.
- JACKSON, L.L. & BLOMQUIST, G.J. Insect waxes. In: KOLATTUKUDY, P.E. (Ed). **Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes**, 1st.ed. Elsevier, Amsterdam. 1976, pp. 201-233.
- JUNGNICKEL, H.; DA COSTA, A.J.S.; TENTSCHEIT, J.; PATRICIO, E.F.L.R.A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; DRIJFHOUT, F.P. & MORGAN, E.D. Chemical basis for inter-colonial aggression in the stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae). **J. Insect Physiol.**, v.50, p.761-766, 2004.
- KRAMER, S. & WIGGLESWORTH, V.B. The outer layer of the cuticle in the cockroach *Periplaneta americana* and the function of the oenocytes. **Quant. J. Microsc. Sci.**, v.91, p.63-73, 1950.
- LANGE, R. Über die futterweitergabe zwischen angehörigen verschiedener Waldameisenstaaten. **Zeitschrift für Tierpsychologie**, v.17, p.389-401, 1960.
- LIANG, D. & SILVERMAN, J. “You are what you eat”: Diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant *Linepithema humile*. **Naturwissenschaften**, v.87, p.412-416, 2000.

- LOCKE, M. The structure and formation of the integument in insects. In: ROCKSTEIN, M. (ED). **The Physiology of Insecta**, vol III. New York and London: Academic Press, 1964, pp.379-470.
- LOCKEY, K.H. Insect cuticular hydrocarbons. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.6511, pp.457-462, 1980.
- LOCKEY, K.H. Insect cuticular lipids. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.8111, pp.263-273, 1985.
- LOCKEY, K.H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.89B, p.595-645, 1988.
- LORENZI, M.C; BAGNÈRES, A.G. & CLÉMENT, J-L. The role of cuticular hydrocarbons in social insects: is it the same in paper wasps? In: TURILLAZZI, S. & WEST-EBERHARD, M.J. (Eds.). **Natural History and Evolution of Paper wasps**. Oxford University Press, UK, 1996, pp. 178-189.
- MONNIN, T. & PETERS, C. Dominance hierarchy and reproductive conflicts among subordinates in a monogynous queenless ant. **Behav. Ecol.**, v.10, p.23-32, 1999.
- MORGAN, E.D. Preparation of small scale samples from insects for chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.236, p.227-235, 1990.
- MORGAN, E.D. **Biosynthesis in insects**. The royal Society of Chemistry, Cambridge, 2004. 199p.
- NELSON D.R. Long-chain methyl-branched hydrocarbons: Occurrence, biosynthesis and function. **Adv. Insect Physiol.**, v.13, p.1-33, 1978.
- NELSON, D.R. Methyl-branched lipids in insects. In: STANLEY-SAMUELSON, D.W. & NELSON, D.R. (Eds.). **Insect lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology**. Lincoln: Nebraska. University of Nebraska Press, 1993, pp.271-315.
- NUNES, T.M.; NASCIMENTO, F.S.; TURATTI, I.C.C.; LOPES, N.P. & ZUCCHI, R. Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? **Animal Behaviour**, v.75, n.3, p.1165-1171, 2008.
- NUNES, T.M.; TURATTI, I.C.C.; MATEUS, S.; NASCIMENTO, F.S.; LOPES, N.P. & ZUCCHI, R. Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age. **Genetics and Molecular Research** (Online), v.8, p.589-595, 2009.
- NUNES, T.M.; Morgan, E.D.; Drijfhout, F.P.; Zucchi, R. Caste-specific cuticular lipids in the stingless bee. **Apidologie** (Celle), v.41, p.579-588, 2010.
- OBIN, M.S. & VANDER MEER, M.K. Sources of nestmate recognition cues in the imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). **Animal Behaviour**, v.36, p.1361-1370, 1988.

OLDHAM, N.J.; BILLEN, J. & MORGAN, E.D. On the similarity of the Dufour gland secretion and the cuticular hydrocarbons of some bumblebees. **Physiological Entomology**, v.19, p.115-123, 1994.

PIANARO, A.; FLACH, A.; PATRÍCIO, E.F.L.R.A.; NOGUEIRA-NETO, P. & MARSAIOLI, A.J. Chemical changes associated with the invasion of a *Melipona scutellaris* colony by *Melipona rufiventris* workers. **J. Chem. Ecol.**, v.33, p.971-984, 2007.

SINGER, T.L. & SPELIER, K.E. Social wasps use nest paper hydrocarbons for nestmate recognition. **Animal Behaviour**, v.44, p.63-68, 1992.

SINGER, T.L.; ESPELIE, K.E. & GAMBOA, G.J. Nest and nestmate discrimination in independent-founding wasps. In: VANDER MEER, R.K.; BREED, M.D.; WINSTON, M.L. & ESPELIE, E.K. (Eds.). **Pheromone communication in social insects**. Westview, Boulder, 1998, pp.104-125.

SLEDGE, M.F.; DANI, F.R.; CERVO, R.; DAPPORTO, L. & TURILLAZZI, S. Recognition of social parasites as nestmates: adoption of colony-specific host cuticular odours by the paper wasp parasite *Polistes sulficer*. **Proc. Roy. Soc. London Serie B – Bio Sci**, v.268, p.2253-2260, 2001.

STEINMETZ, I.; SCHMOLZ, E. & RUTHER, J. Cuticular lipids as trail pheromone in a social wasp. **Proc. Roy. Soc. London**, v.270, p.385-391, 2003.

VANDER MEER, R.K. & MOREL, L. Nestmate recognition in ants. In: VANDER MEER, R.K.; BREED, M.D.; WINSTON, M.L. & ESPELIE, E.K. (Eds.). **Pheromone communication in social insects**. Westview, Boulder, 1998, pp.79-103.

VOGEL, S. Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung: Über Bau und Funktion der Osmophoren. **Akad. Wiss. Lit. Abh. Math. Naturwiss. KI.**, (Mainz), v.1962, p.599-763, 1963.

VOGEL, S. 1974. Ölblumen and olsammelnde Bienen. **Akad. Wiss. Lit. Abh. Math. Naturwiss. KI.** (Mainz), Trop. Subtrop. Pflanz., v.7, p.1-267, 1974.

WIGGLESWORTH, V.B. **The Principles of Insect Physiology**. London, Methuen, England. 1965.

WIGGLESWORTH, V.B. Structural lipids in the insect cuticle and the function the oenocytes. **Tissue Cell**, v.2, p.155-179, 1970.

5. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comunicação química tem grande importância nas espécies de insetos sociais, nas quais as interações entre os indivíduos são necessariamente mais complexas. As substâncias atuando como sinais químicos são na sua maior parte produzidas em glândulas exócrinas cuja morfologia, ciclo secretor, citoquímica e comparação entre os componentes das sociedades de abelhas, tem sido bastante estudados (FREE, 1980; WINSTON, 1987; CRUZ-LANDIM & ABDALLA, 2002; CRUZ-LANDIM, 2009). Os feromônios são substâncias químicas, normalmente de alta volatilidade, que são secretados externamente e provocam respostas fisiológicas e comportamentais entre indivíduos da mesma espécie (KARLSON & BUTENANDT, 1959; WILSON, 1963).

Karlson e Butenandt (1959) classificaram os feromônios em moduladores (*primers*) e desencadeadores (*releasers*). Os moduladores alteram a fisiologia do indivíduo receptor e o prepara para um novo conjunto de comportamentos, enquanto os desencadeadores evocam diretamente respostas comportamentais. Em *A. mellifera*, os feromônios moduladores exercem função na organização social, tal como a inibição da reprodução das operárias, enquanto os feromônios desencadeadores exercem função na atração sexual, marcação de trilha, reconhecimento e alarme (FREE, 1987).

Embora não faça parte direta do objetivo das observações realizadas, vale a pena discutir a classificação proposta por Karlson e Butenandt diante dos resultados obtidos com a finalidade de fazer uma reflexão sobre as interpretações dadas aos relativamente recentes estudos sobre a natureza química dos compostos cuticulares e secreções glandulares nas abelhas (DANI et al., 2001; ABDALLA et al., 2003; JARAU et al., 2006; 2010; SCHORKOPF et al., 2007; NUNES et al., 2009; 2010; STANGLER et al., 2009; FERREIRA-CALIMAN et al., 2010).

Em sociedades como as das abelhas eussociais em que os componentes da sociedade estão reunidos em estruturas coloniais com diferentes tipos de indivíduos desempenhando funções pré-determinadas, sujeitas a variações etário/fisiológicas, eventualmente modificadas por fatores ambientais, a circulação de sinais que integrem as ações desses indivíduos é fundamental para o funcionamento harmônico da colônia. Geralmente as ações levadas a efeito pelos integrantes das colônias são separadas em dois tipos: regulação social (sob ação de moduladores) e comunicação propriamente dita (sob ação de desencadeadores). Nos himenópteros eussociais a regulação social consistiria primordialmente na divisão do trabalho reprodutivo entre as castas, operárias

e a rainha, enquanto a comunicação responderia pela coordenação das ações de construção, manutenção e abastecimento da colônia, tarefas exercidas pelas operárias.

Na regulação social a tendência é partir-se para a interpretação de que a rainha exerce controle sobre a reprodução das operárias, fato que parece ter sido demonstrado em *A. mellifera* (WILSON, 1971; MICHENER, 1974; WATSON et al., 1985; ROSS & MATTHEWS, 1991), enquanto esse controle não está claro nos meliponíneos, mesmo nas espécies em que as operárias só ativam seus ovários em colônias órfãs (NUNES et al., 2010). Contudo, as operárias podem ser reconhecidas pela composição das substâncias presentes em sua cutícula (NUNES et al., 2009; FERREIRA-CALIMAN et al., 2010). Os resultados apresentados nos artigos 4.2 e 4.4 demonstram que no que se refere aos compostos cuticulares a sua função é basicamente a de reconhecimento, como pode ser deduzido do fato de sinalizarem fase/função das operárias, portanto a mesma função que na rainha.

Os compostos cuticulares, como demonstrado no Capítulo 4.2 para *A. mellifera* e *M. quadrifasciata* podem ter contribuição da GSC e no caso da primeira espécie também de lipídios ingeridos e excretados por essa glândula (Capítulo 4.1). Interessante teria sido verificar se entre os compostos cuticulares da rainha de *A. mellifera* se encontrariam os ácidos graxos produzidos em suas glândulas mandibulares e tidos como agentes da “dominância” da rainha sobre as operárias nesta espécie (SLESSOR et al., 1990; PANKIW et al., 1996; HOOVER et al., 2003; KEELING et al., 2003; KATZAV-GOZANSKY, 2006). Admitindo que estejam presentes, as diferenças entre a composição dos compostos de superfície serviriam como nos meliponíneos, para reconhecimento da presença e estado da rainha e não necessariamente lhe confeririam a capacidade de controlar a fisiologia/comportamento das operárias. O que está se pretendendo dizer é que a interpretação de que as rainhas controlam ou comandam a sociedade porque são os indivíduos com plena capacidade reprodutiva pode ser apenas uma interpretação antropomórfica. Não há dúvida que a regulação social em *Apis* diverge dos meliponíneos quanto à fisiologia e comportamento das operárias, mas o mecanismo pelo qual ela se estabelece pode também resultar de uma auto-regulação sob ação hormonal, resultante do reconhecimento da presença de uma rainha atuante. Neste sentido os feromônios não voláteis tanto nas interações entre operárias em diferentes fases/funções como entre rainha e operárias atuariam como moduladores, por via hormonal, confirmando dados que, por exemplo, relatam a ação do hormônio juvenil na passagem das atividades intra-coloniais para o forrageamento (JAYCOX et al., 1974;

RUTZ et al., 1976; MULLER & HEPBURN, 1994; NIYHOUT, 1994). O capítulo 4.3 parece fornecer um dado a favor dessa interpretação na medida em que demonstra que as operárias de *S. postica* na fase em que trabalham na área de cria constituem um grupo heterogêneo quanto à composição da secreção das GSC. Esse dado pode ser interpretado como um efeito a médio prazo dos feromônios de superfície e/ou uma preparação hormonalmente modulada para a passagem das funções intra para extra coloniais.

Admitindo que na regulação social o que funciona é o reconhecimento da presença das várias categorias de componentes da sociedade e de seus respectivos estados fisiológicos e funções coloniais como determinante da homeostase colonial, ou seja, de uma auto-regulação das ações dos indivíduos, chega-se à colônia funcionando como um super-organismo (MORITZ & SOUTHWICK, 1992) sem ser necessário o conceito de dominância.

As presentes considerações, embora um pouco desvinculadas dos resultados da presente investigação, no entanto, permitem neles pensar de uma maneira menos ligada a inter-relações que embora estatisticamente confirmadas só por observação indireta têm a função que lhes é atribuída.

6. CONCLUSÕES FINAIS

A partir dos resultados apresentados nos 4 capítulos é possível inferir que os objetivos da pesquisa foram alcançados e as hipóteses aceitas e concluir que:

- as glândulas de *A. mellifera* e *S. postica* apresentam diferenças as quais podem estar relacionadas à função e ao ciclo secretor. Enquanto em *A. mellifera* as glândulas só produzem hidrocarbonetos, têm provavelmente papel excretor e são ativas em todas as fases das operárias, em *S. postica* sintetizam principalmente ésteres e outros compostos oxigenados, não têm papel excretor e não são ativas nas campeiras;

- os compostos da secreção glandular e da superfície cuticular diferem entre os grupos das operárias (RE, AC e FO), nas três espécies estudadas, *A. mellifera*, *S. postica* e *M. quadrifasciata* permitindo reconhecimento da fase/função da operária na colônia;

- a correlação dos compostos encontrados na superfície cuticular e na secreção glandular foi positiva para as operárias de *A. mellifera* e *M. quadrifasciata*, o que quer dizer que os principais compostos são os mesmos tanto para glândula quanto para

superfície cuticular, caracterizando uma possível origem de parte desses compostos a partir da secreção;

- na superfície cuticular de operárias de *A. mellifera* predominam os alcanos em todas as fases das operárias e pequena quantidade de aldeídos está presente principalmente em FO;

- os alcenos predominam em todas as fases das operárias de *M. quadrifasciata* e os compostos oxigenados, embora encontrados em pequena quantidade, estão presentes em todas as fases da operária.

- a superfície cuticular de operárias de *S. postica* contém, além de hidrocarbonetos, compostos oxigenados (alcoóis, cetonas e ésteres) e como nas outras espécies estudadas sinaliza a fase/função das operárias. Observou-se maior quantidade de alcanos nos indivíduos mais jovens (RE) e conforme passam a desempenhar tarefas na colônia (AC) e fora dela (FO) ocorre diminuição dos alcanos e aumento na quantidade de alcenos;

- a correlação dos compostos encontrados na superfície cuticular e na secreção glandular foi negativa para *S. postica* já que os compostos glandulares são completamente diferentes do perfil químico cuticular sugerindo papel na comunicação por trilha de cheiro em vez de reconhecimento.

- Operárias de *S. postica* que trabalham na área do favo de cria (AC) puderam ser alocadas a subgrupos em razão de diferenças na composição glandular podendo indicar sinalização das diferentes atividades executadas por estas operárias na área do favo ou preparação para a transição das tarefas intra para extra-coloniais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÅGREN, L.; CEDERBERG, B. & SVENSSON, B.G. Changes with age in ultrastructure and pheromone content of male labial glands in some bumble bee species (Hymenoptera, Apidae). **Zoon**, v.7, p.1-14, 1979.
- ABDALLA, F.C.; JONES, G.R.; MORGAN, E.D. & CRUZ-LANDIM, C. Comparative study of the cuticular hydrocarbons composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. **Genet. Mol. Res.**, v.2, p.191-199, 2003.
- ARNOLD, G. & DELAGE-DARCHEN, B. Nouvelles données sur l'équipement enzymatique des glandes salivaires de l'ourvière d' *Apis mellifera* (Hyménoptère, Apide). **Ann. Sc. Nat. Zool.**, 12^a série, v.20, p.401-422, 1978.
- ARNOLD, G.; QUENET, B.; CORNUET, J.M.; MASSON, C.; SCHEPPER, B. DE; ESTOUP, A. & GASQUE, P. Kin recognition in honey bees. **Nature**, v.379, p.498, 1996.
- BERTSCH, A.; SCHWEER, H.; TITZE, A. & TANAKA, H. Male labial gland secretions and mitochondrial DNA markers support species status of *Bombus cryptarum* and *Bombus magnus* (Hymenoptera, Apidae). **Insect Soc.**, v.52, p.45 – 54, 2005.
- BRIAN, M.V. **Social Insect Ecology and Behavioural Biology**. London: Chapman & Hall. 1983. 353p.
- CRUZ-LANDIM, C. Estudo comparativo de algumas glândulas das abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. **Arq. Zool.**, São Paulo, v.15, n.3, p.177-290, 1967.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: Morfologia e Função de Sistemas**. São Paulo: Ed. UNESP. 2009. 408p.
- CRUZ-LANDIM, C. & ABDALLA, F.C. **Glândulas exócrinas das abelhas**. Ribeirão Preto: Ed. FUNPEC. 2002. 181p.
- CRUZ-LANDIM, C. & MELLO, M.L.S. The post-embryonic changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apoidea). II Development of the salivary glands system. **J. Morphol.**, New York, v.123, p.481-502, 1967.
- DANI, F.R.; JONES, G.R.; DESTRI, S.; SPENCER, S.H. & TURILLAZI, S. Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. **Anim. Behav.**, v.62, p.165-171, 2001.
- DELAGE-DARCHEN, B.; TABEC, S. & DARCHEN, R. Secretion Enzymatique des Glandes Salivaires et de L'Intestin Moyen d'une Abeille Sans Dard, *Apotrigona nebulata* (Sur.) (Hyménoptères, Apidés). **Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.**, v.13, p.261-267, 1979.

- DOWNS, S.G. & RATNIEKS, F.L.W. Recognition of conspecifics by honeybee guards uses nonheritable cues acquired in the adult stage. **Anim. Behav.**, v.58, p.643-648, 1999.
- FERREIRA-CALIMAN, M.J.; NASCIMENTO, F.S.; TURATTI, I.C.; MATEUS, S.; LOPES, N.P. & ZUCCHI, R. The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. *Journal of Insect Physiology*, v.56, p.800-804, 2010.
- FIELDER, A.M.. Power of recognition among ants. **Biological Bulletin of the Marine Biological Laboratory**, v.7, p.227-250, 1904.
- FREE, J.B. **The social organization of the bumblebee colony**. Fleet, Hants, U.K.: The Central Association of the Bee-Keepers, 1961.
- FREE, J.B. **A organização social das abelhas (Apis)**. São Paulo: EPU: Editora da Universidade de São Paulo, v.13. 1980. 79p.
- FREE, J.B. **Pheromones of social bees**. New York: Cornell University Press, Ithaca. 1987.
- GAMBOA, G.J. Kin recognition in social wasps. In: TURILLAZZI, S. & WEST-EBERHARD, M.J. (Eds.). **Natural History and Evolution of Paper Wasps**. Oxford University Press., 1996, p.161-177.
- HANGARTNER, W.; REICHSON, J.M.; WILSON, E.O. Orientation to nest material by the ant *Pogonomyrmex badius* (Latreille). **Anim. Behav.**, v.18, p.331-334, 1970.
- HEFTZ, A. The role of Dufour's gland secretions in bees. **Physiol. Entomol.**, v.12, p.243-253, 1987.
- HEFTZ, A.; TENGÖ, J.; LÜBKE, G. & FRANCKE, W. Inter-colonial and intra-colonial variation in Dufour's gland secretion in bumble bee species of *Bombus hypinorum* (Hymenoptera: Apidae). In: WEISE, K.; GRIBAKIN, F.G. & RENNINGER, G. (Eds). **Sensory Systems of Arthropods**. Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, p.469-480.
- HEPPER, P.G. Kin recognition: functions and mechanisms. **Biol. Rev.**, v.61, p.63-93, 1986.
- HESELHAUS, F. Die Hautchüsen der Apiden und Verwandter formen. *Zool. Jahrb. Jena Abt. J. Anat.*, v.43, p.363-464, 1922.
- HÖLLDOBLER, B. & MICHENER, C.D. Mechanisms of identification and discrimination in social hymenopter. In: MARKL, H. (Ed.). **Evolution of social behaviour**. Weinheim: Verlag Chemie, 1980, p.35-58.
- HOOVER, S.E.R.; KEELING, C.I.; WINSTON, M.L. & SLESSOR, K.N. The effect of queen pheromones on worker honey bee ovary development. **Naturwiss.**, v.90, p.477-480, 2003.

HOWARD, R.W. Cuticular hydrocarbons and chemical communication. In: STANLEY-SAMUELSON, D.W. & NELSON, D.R. (Eds.). **Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology**. Lincoln: Univ. Neb. Press, 1993, p.179-226.

HOWARD, R.W. & BLOMQUIST, G.J. Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects Of Insect Hydrocarbons. **Annu. Rev. Entomol.**, v.50, p.371-393, 2005.

HUBBARD, M.D. Influence of nest material and colony odor on digging in the ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera, Formicidae). **J. Georgia Entomol.**, v.9, p.127-132, 1974.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Miscellaneous observations on the behavior of *Schwarziana quadripunctata*. **Bol. Zool. E Biol. Marinha** (Universidade de São Paulo), v.3, p.633-640, 1973.

JARAU, S.; HANCIR, M.; ZUCCHI, R. & BARTH, F.G. A Stingless Bee Uses Labial Gland Secretions for Scent Trail Communication (*Trigona recursa* Smith, 1863). **Journal of Comparative Physiology: A Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology**, v.190, n.3, p.233-239, 2004.

JARAU, S.; SCHULZ, M.; HRNCIR, M.; FRANCKE, W.; ZUCCHI, R.; BARTH, F.G. & AYASSE, M. Hexyl decanoate, the first trail pheromone compound identified in a stingless bee, *Trigona recursa*. **J. Chem. Ecol.**, v.32, p.1555-1564, 2006.

JARAU, S.; DAMBACHER, J.; TWELE, R.; AGUILAR, I.; FRANCKE, W. & AYASSE, M. The trail pheromone of a stingless bee, *Trigona corvina* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), varies between population. **Chemical Senses**, v.35, n.7, p.593-601, 2010.

JAYCOX, E.R.; SKONRONEK, W. & GUYNN, G. Behavioral changes in worker honeybee (*Apis mellifera*) induced by injections of a juvenile hormone mimic. **Ann. Entomol. Soc. Amer.**, v.67, p.529-534, 1974.

JUNGNICKEL, H.; DA COSTA, A.J.S.; TENTSCHERT, J.; PATRÍCIO, E.F.L.R.A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; DRIJFHOUT, E.D. & MORGAN, E.D. Chemical basis of inter-colonial aggression in the stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae). **J. Insect Physiol.**, v.50, p.761-766, 2004.

KARLSON, P. & BUTENANDT, A. Pheromones (ectohormones) in insects. **An. Rev. Entomol.**, v.4, p.39-58, 1959.

KATZAV-GOZANSKY, T. The evolution of honeybee multiple queen-pheromones - a consequence of a queen-worker arms race? **Braz. J. morphol. Sci.**, v.23, n.3-4, p.287-294, 2006.

KATZAV-GOZANSKY, T.; SOROKER, V.; IONESCU, A.; ROBINSON, G.E. & HEFETZ, A. Task-related chemical of labial gland volatile secretion in worker honeybees (*Apis mellifera ligustica*). **J. Chem. Ecol.**, v.27, n.5, p.919-926, 2001.

- KEELING, C.I.; SLESSOR, K.N.; HIGO, H.A. & WINSTON, M.L. New components of the honey bee (*Apis mellifera* L.) queen retinue pheromone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.100, n.8, p.4486-4491, 2003.
- KERR, W.E. Estudos sobre a genética de populações de Himenópteros em geral e dos Apíneos sociais em particular. Tese de livre docência. **Ann. Esc. Sup. de Agric. L. de Queiroz**, v.8, p.219-354, 1951.
- LAHAV, S.; SOROCKER, V.; HEFETZ, A. & MEER, R.K.V. Direct behavioural evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. **Naturwiss.**, v.86, p.246-249, 1999.
- LANGE, R. Über die Futterweitergabe zwischen angehörigen verschiedener Waldameisenstaaten. **Z. Tierpsychol.**, v.17, p.389-401, 1960.
- LOCKEY, K.H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparable Biochemistry and Physiology**, v.89B, p.595-645, 1988.
- LOCKEY, K.H. Insect hydrocarbons classes: Implications for chemotaxonomy. *Insect Biochem.*, v.21, p.91-97, 1991.
- MICHENER, C.D. **The social behavior of the bees - A comparative study.** Cambridge, Harvard University Press. 1974. 404p.
- MORITZ, R.F.A. & HILLESHEIM, E. Trophallaxis and genetic variance of kin recognition in honey bees, *Apis mellifera* L. **Anim. Behav.**, v.40, p.641-647, 1990.
- MORITZ, R.F.A. & SOUTHWICK, E.E. **Bees as superorganisms: An evolutionary reality.** Germany: Springer-Verlage Berlin Heidelberg. 1992. 395p.
- MULLER, W.J. & HEPBURN, H.R. Juvenile hormone III and wax secretions in honeybees (*Apis mellifera capensis*). **J. Insect Physiol.**, v.14, p.873-881, 1994.
- NIYHOUT, H.E. **Insect Hormones.** Princeton: Princeton Univ. Press. 1994.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação das Abelhas sem Ferrão.** São Paulo: Nogueirapis. 1997. 445p.
- NUNES, T.M.; TURATTI, I.C.C.; LOPES, N.P. & ZUCCHI, R. Chemical Signals in the Stingless Bee, *Frieseomelitta varia*, Indicate Caste, Gender, Age, and Reproductive Status. **Journal of Chemical Ecology**, v.35, p.1172-1180, 2009.
- NUNES, T.M.; MORGAN, E.D.; DRIJFHOUT, F.P. & ZUCCHI, R. Caste-specific cuticular lipids in the stingless bee *Friesella schrottkyi*. **Apidologie**, v.41, p.579-588, 2010.
- OBIN, M.S. & VANDER MEER, R.K. Sources of nestmate recognition cues in the imposed fire ant *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera, Formicidae). **Anim. Behav.**, v.36, p.1361-1370, 1988.

- PANKIW, T.; WINSTON, M.L.; PLETTNER, E.; SLESSOR, K.N.; PETTIS, J.S. & TAYLOR, O.R. Mandibular gland components of European and Africanized honey bee queens (*Apis mellifera* L.). **J. Chem. Ecol.**, v.22, p.605-615, 1996.
- POIANI, S. B. & CRUZ-LANDIM, C. Cephalic salivary gland ultrastructure of worker and queen eusocial bees (Hymenoptera, Apidae). **Animal Biology**, v.59, p.299-311, 2009.
- POIANI, S.B. & CRUZ-LANDIM, C. Morphological changes in the cephalic salivary glands of females and males of *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Biosciences**, v.35, n.2, p., 2010a.
- POIANI, S.B. & CRUZ-LANDIM, C. Changes in the size of cephalic salivary glands of *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae) queens and workers in different life phases. **Zoologia**, v.27, n.6, p.961-964, 2010b.
- POIANI, S.B. & CRUZ-LANDIM, C. Cephalic salivary glands of two species of advanced eusocial bees (Hymenoptera: Apidae): morphology and secretion. **Zoologia**, v.27, n.6, p.979-985, 2010c.
- ROIG-ALSINA, A. & MICHENER, C.D. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). **The University of Kansas Science Bulletin**, v.55, p.123-173, 1993.
- ROSS, K.G. & MATTHEWS, R.W. **The Social Biology of Wasps**. Ithaca: Cornell University Press. 1991.
- ROUBIK, D.W. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. Cambridge University Press. 1992. 514p.
- RUTZ, W.; GERIG, L.; WILLE, H. & LÜSCHER, M. the function of juvenile hormone in adult worker honeybee (*Apis mellifera*). **J. Insect Physiol.**, v.22, p.1485-1491, 1976.
- SANTOS, C.G.; MEGIOLARO, F.; SERRÃO, J.E. & BLOCHTEIN, B. Morphology of the head salivary and intramandibular glands of the stingless bee *Plebeia emerina* (Friese) (Hymenoptera, Meliponini) workers associated with propolis. **Annals of Entomological society of America**, v.102, p.137-143, 2009.
- SCHORCOPF, D.L.P.; JARAU, S.; FRANCKE, W.; TWELE, R.; ZUCCHI, R.; HRNCIR, M.; SCHMIDT, V.M.; AYASSE, M. & BARTH, F. G. Spitting out information: Trigona bees deposit saliva to signal resource locations. **Proc. R. Soc. B.**, v.274, p.895-898, 2007.
- SILVA DE MORAES, R.L.M. Glândulas Salivares do Adulto. In: CRUZ-LANDIM, C. & ABDALLA, F.C. (Eds.). **Glândulas Exócrinas das Abelhas**. Ribeirão Preto: FUNPEC – RP, 2002, p.51-70.
- SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R. & ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. 1ed. Belo Horizonte. 2002. 253p.

- SIMPSON, J. The Functions of the Salivary Glands of *Apis mellifera*. **J. Insect Physiol.**, v.4, n.2, p.107-121, 1960.
- SIMPSON, J.; RIEDEL, I.B.M. & WILDING, N. Invertase in the Hypopharyngeal Gland of the Honeybee. **J. Apic. Res.**, v.7, n.1, p.29-36, 1968.
- SINGER, T.L. Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. **Amer. Zool.**, v.38, p.394-405, 1998.
- SLESSOR, K.N.; KAMINSKI, L-A.; KING, G.G.S. & WINSTON, M.L. Semiochemicals of the honey bee queen mandibular glands. **J. Chem. Ecol.**, v.16, p.851-860, 1990.
- SNODGRASS, R.E. **Anatomy of the Honey Bee**. New York: Vail-Balloy Press. 1956. 334p.
- SOROCKER, V. & HEFETZ, A. Hydrocarbon site of synthesis and circulation in the desert ant *Cataglyphis niger*. **J. Insect Physiol.**, v.46, p.1097-1102, 2000.
- SOROCKER, V.; VIENNE, C.; NOWBAHARI, E. & HEFETZ, A. The postpharyngeal gland as a “Gestalt” organ for nestmate recognition in the ant *Cataglyphis niger*. **Naturwiss.**, v.81, p.510-513, 1994.
- STANGLER, E.S.; JARAU, S.; HRNCIR, M.; ZUCCHI, R. & AYASSE, M. Identification of trail pheromone compounds from the labial glands of the stingless bee *Geotrigona mombuca*. **Chemoecology**, v.19, p.13-19, 2009.
- TERZO, M.; COPPENS, P.; VALTEROVÁ, I.; TOUBEAU, G. & RASMONT, P. Does behaviour replace male scent marking in some bumblebees? Evidence of the absence of sexual marking cephalic secretion in the subgenus *Rhodobombus*. **21st Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology – ISCE**, Washington, 2005.
- WATSON, J.A.L.; OKOT-KOTBER, B.M. & NOIROT, C.H. **Caste Differentiation in Social Insects**. Oxford: Pergamon Press. 1985.
- WILSON, E.O. Pheromones. **Sci. Amer.**, v.208, n.5, p.100, 1963.
- WILSON, E.O. **The insect societies**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. 1971. 548p.
- WINSTON, M.L. **The Biology of the Honey Bee**. London: Harvard University Press. 1987. 281p.