

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ZOOLOGIA)**

---

**SEMIOQUÍMICOS E COMUNICAÇÃO SONORA EM FORMIGAS CORTADEIRAS  
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

**AMANDA APARECIDA CARLOS**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

**Dezembro - 2013**

**AMANDA APARECIDA CARLOS**

**Semioquímicos e comunicação sonora em formigas cortadeiras  
(Hymenoptera: Formicidae)**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

**Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno**

**Rio Claro  
2013**

595.796 Carlos, Amanda Aparecida  
C284s Semioquímicos e comunicação sonora em formigas  
cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) / Amanda Aparecida  
Carlos. - Rio Claro, 2013  
159 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Odair Correa Bueno

1. Formiga. 2. Hidrocarbonetos. 3. Estridulação. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Semioquímicos e comunicação sonora em formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae)

**AUTORA:** AMANDA APARECIDA CARLOS

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO

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



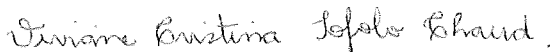
Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO  
Departamento de Biologia / Instituto de Biotecnologia de Rio Claro/UNESP



Prof. Dr. ANDRÉ LÚCIO FRANCESCINI SARRIA  
Pós-Doutorando do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos



Profa. Dra. SANDRA VERZA DA SILVA  
Pós-Doutoranda do Centro de Estudos de Insetos Sociais/IBRC/UNESP



Profa. Dra. VIVIANE CRISTINA TOFOLO CHAUD  
Pós-Doutoranda do Centro de Estudos de Insetos Sociais/IBRC/UNESP



Profa. Dra. ANA EUGENIA DE CARVALHO CAMPOS  
Instituto Biológico de São Paulo

Data da realização: 16 de dezembro de 2013.

*Ofereço,*

À Jakob P. Gänzler e Maria Helena

## ***Agradeço,***

Ao **Prof. Dr. Odair Correa Bueno** pela oportunidade e orientação.

Aos **Prof. Dr. João Batista Fernandes, Dr. André F. Sárria e Msc. Karla Malaquias** da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pelo auxílio nas prévias e definições das condições de rampa do experimento 1 e pelo auxílio nas análises químicas e na discussão dos dados dos experimentos da parte 2 do presente estudo.

Ao **Prof. Dr. Luiz Carlos Forti** da Universidade Estadual Paulista J.M.F. (UNESP – Botucatu/FCA) por conceder sua área de estudo para a coleta dos alados.

À **Dr. Cintia Maria Santos Bezerra, Letícia Angelini e Joana Mantovani**, pelo auxílio nas coletas de alados e operárias.

Ao **Dr. Túlio M. Nunes** (Universidade de São Paulo – USP/Ribeirão Preto) pelos ensinamentos, auxílio e confirmação dos compostos químicos identificados, além de contribuições importantíssimas no experimento 1.1. Para **Izabel Cristina Turatti e Dr. Sidnei Mateus**, pelo auxílio técnico.

Ao **Dr. Eduardo Arrivabene Diniz** pela amizade, auxílio nos registros de vibrações sonoras e mensuração dos dados de *Trachymyrmex fuscus*.

Às biólogas **Marcela Ceccato e Itamar Reiss** pela amizade, companheirismo, auxílio técnico e exemplos de profissionalismo.

À **Sandra Verza da Silva** pela amizade e sugestões no texto.

Aos botânicos **Msc Leonardo Biral** (UNESP) e **Msc Marcelo Monge** (UNICAMP) pela identificação e auxílio nas coletas do experimento 2.1.

Aos colegas de laboratório: **Catarina Munhoz, Manuela Ramalho, Nathália Lorenzon, João Paulo Reato Nascimento, Natália Marin e Pâmela Décio** pela agradável convivência nestes anos. À **Rosangela M. Ribeiro Nogueira e Necis Miranda** por todo apoio de secretariado.

Ao meu grande amor, **Jakob P. Gänzler**, por todo seu carinho, paciência e auxílio na leitura dos artigos em alemão, **Te amo muito!**

À **FAPESP (Processo 2009/17793-8)** pela bolsa de estudos e apoio financeiro concedido.

Aos amigos de república: **Danilo Kennedy, Tiago P. de Souza, Felipe Guerra, Bruno Engelbrecht, Henrique Carneiro, Roger Dias, Luis Henrique Aquaroli, Justus Scholz** pela acolhida, churrascos, cervejas e risadas.

Para minhas amigas-irmãs: **Beatriz Steck, Anne Arruda e Karol Gonçalves**, em que amizade é sentir-se perto mesmo quando se está longe.

À **José Eduardo Bertini**, por seu incondicional apoio no início dessa empreitada.

À **minha família** por compreender minha constante ausência.

Às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

E, principalmente as **formigas cortadeiras** e ao seu mundo maravilhoso.

*Uma formiga atravessa, em diagonal, a página ainda em branco.*

*Mas ele, aquela noite, não escreveu nada.*

*Para quê?*

*Se por ali já havia passado o frêmito e o mistério da vida.*

*(Mario Quintana)*



## RESUMO

As formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*) são consideradas importantes pragas na região Neotropical, sendo necessários métodos efetivos de controle para conter os danos. Estudos que explorem sua biologia, ecologia e comportamento são de vital importância para o entendimento da sociedade destes insetos, fornecendo subsídios para o manejo adequado. Deste modo, foi proposto o uso de hidrocarbonetos cuticulares e da estridulação destas formigas como ferramentas para a identificação de quatro espécies do gênero *Atta*. Verificou-se a interação de operárias de *A. sexdens rubropilosa* com hidrocarbonetos epicuticulares oriundos de ceras de plantas de Cerrado (*Virola sebifera*, *Tocoyena formosa*, *Schefflera vinosa*) e uma exótica (*Acalypha wilkesiana*); além de tricomas de *V. sebifera*. Ainda utilizando *A. sexdens rubropilosa* como modelo, comparou-se o padrão de estridulação dela com duas espécies intermediárias da tribo Attini (*Trachymyrmex fuscus* e *Trachymyrmex tucumanus*). Também foi descrito o perfil sonoro de distintas castas (rainhas, fêmeas não fecundadas, machos, soldados e operárias) de *A. sexdens rubropilosa*, além das vibrações produzidas por *A. laevigata* durante o processamento do substrato vegetal no fungo simbionte. Com os dados obtidos foi possível verificar a especificidade dos hidrocarbonetos cuticulares para as espécies estudadas (*A. capiguara*, *A. sexdens rubropilosa*, *A. bisphaerica* e *A. laevigata*). Na interação dos hidrocarbonetos epicutulares caracterizados nas plantas estudadas verificou-se que eles são atrativos para operárias de *A. sexdens rubropilosa* e apesar do estímulo químico ser o que define a escolha da planta a ser forrageada, não foram os hidrocarbonetos os compostos responsáveis por esta seleção. Quanto aos sinais acústicos, o perfil sonoro é distinto entre as formigas intermediárias e ambas estas espécies diferem da mais derivada analisada (*A. sexdens rubropilosa*). O perfil de estridulação entre as quatro espécies de fêmeas não fecundadas estudadas, não diferiram, porém ocorreu uma clara distinção entre as castas reprodutoras de forrageiras e soldados de *A. sexdens rubropilosa*. Durante o processamento do material vegetal por operárias de *A. laevigata* as vibrações nas folhas causadas pela estridulação das operárias diferem conforme o comportamento executado e este sinal se mantém constante durante todo o processamento do substrato. Com base neste estudo, no gênero *Atta*, os sinais químicos foram mais espécie-específico do que os sonoros e ambos os sinais influenciaram nos comportamentos relacionados ao forrageamento.

**Palavras chave:** formigas cortadeiras, comunicação, hidrocarbonetos, estridulação.

## ABSTRACT

The leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) are considered a significant plague in the neotropics, demanding efficient methods of control in order to contain the detrimental impact. Studies on their biology, ecology and behavior are of vital importance for the understanding of these insect societies, providing information on the adequate handling and control of these species. Regarding this aspect the use of cuticular hydrocarbons and stridulation of these ants was proposed as tool for the identification of four species of the genus *Atta* spp. The interaction of *A. sexdens rubropilosa* workers with wax derived epicuticular hydrocarbons from native scrubland (“cerrado”) plants and one exotic plant as well as with trichomes from *V. sebifera* was observed. Further on, still using *A. sexdens rubropilosa* as a model, its stridulatory pattern was compared with two intermediate species of the *Attini* tribe. The acoustic pattern of distinct castes (queens, non fertilized females, males, soldiers and workers) of *A. sexdens rubropilosa* and the vibrations of *Atta laevigata* during the processing of vegetal substrate on the symbiotic fungus were described as well. With this data it was possible to infer the specificity of cuticular hydrocarbons for the species studied (*Atta capiguara*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta bisphaerica* and *Atta laevigata*). The interaction of epicuticular hydrocarbons of the studied plants with *A. sexdens rubropilosa* workers showed that, although chemical stimulus decides the ants` choice to carry a certain plant, the hydrocarbons were not the decisive compounds for this selection. The acoustic patterns of the intermediate ant species are distinct and both species acoustically differ from *A. sexdens rubropilosa*, the most derived species investigated. It was not possible to determine a species-specific acoustic pattern for non fertilized females, while in *A. sexdens* the reproducing castes showed clear separation from the workers and soldiers. The leaf vibrations caused by the stridulation of *Atta laevigata* workers processing vegetal material differ regarding the behavior executed, these signals showed to be stable during the processing of the substrate. The present study suggests species specific chemical signals for the genus *Atta*. The chemical and acoustic signals influenced the foraging related behavior.

**Key words:** leaf-cutting ants, communication, hydrocarbons, stridulation

## SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	12
<b>PARTE I – SEMIOQUÍMICOS em <i>Atta</i> sp.: Hidrocarbonetos cuticulares</b> .....	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	18
1.1. Identificação das castas temporárias de <i>Atta capiguara</i> , <i>Atta laevigata</i> , <i>Atta bisphaerica</i> e <i>Atta sexdens rubropilosa</i> pelo perfil de hidrocarbonetos cuticulares (Hymenoptera: Formicidae).....	20
Resumo .....	20
1.1.1 Introdução .....	21
1.1.2 Material e Métodos .....	23
1.1.3 Resultados .....	26
1.1.4 Discussão .....	34
1.1.5 Referências Bibliográficas .....	36
<b>PARTE II – Influência dos SEMIOQUÍMICOS na atratividade das plantas para as formigas cortadeiras</b> .....	38
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
2.1. O papel dos hidrocarbonetos presentes em ceras epicuticulares na atratividade para operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (Hymenoptera, Formicidae). .....	48
Resumo .....	48
2.1.1. Introdução .....	50
2.1.2. Material e Métodos .....	51
2.1.3 Resultados .....	55
2.1.4. Discussão .....	69
2.1.5. Referências Bibliográficas .....	72
2.2. Avaliação de interesse de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (Hymenoptera, Formicidae) por tricomas de <i>Virola sebifera</i> .....	74

Resumo .....	74
2.2.1. Introdução .....	75
2.2.2. Material e Métodos .....	76
2.2.3. Resultados .....	79
2.2.4. Discussão .....	86
2.2.5. Referências Bibliográficas .....	89
<b>PARTE III – Sinais SONOROS em <i>Atta</i> sp.</b> .....	90
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97
3.1. Bioacústica de <i>Trachymyrmex fuscus</i> , <i>Trachymyrmex tucumanus</i> e <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (Hymenoptera: Formicidae).....	101
Resumo .....	101
3.1.1. Introdução .....	102
3.1.2. Material e Métodos .....	103
3.1.3. Resultados e Discussão .....	104
3.1.4. Referências Bibliográficas .....	109
3.2. Padrão sonoro de fêmeas não fecundadas de <i>Atta laevigata</i> , <i>Atta capiguara</i> , <i>Atta sexdens rubropilosa</i> e <i>Atta bisphaerica</i> (Hymenoptera: Formicidae). .....	111
Resumo .....	111
3.2.1. Introdução .....	112
3.2.2. Material e Métodos .....	113
3.2.3. Resultados e Discussão .....	115
3.2.4. Referências Bibliográficas .....	127
3.3. Diferenciação de castas de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (Hymenoptera: Formicidae) pelo perfil sonoro. ....	128
Resumo .....	128
3.3.1. Introdução .....	129
3.3.2. Material e Métodos .....	130
3.3.3. Resultados e Discussão .....	131
3.3.4. Referências Bibliográficas .....	140
3.4. Sinais sonoros das operárias de <i>Atta laevigata</i> (Hymenoptera: Formicidae) durante o processamento de substrato no fungo simbionte .....	142
Resumo .....	142

3.4.1. Introdução .....	143
3.4.2. Material e Métodos .....	144
3.4.3. Resultados .....	145
3.4.5. Referências Bibliográficas .....	152
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	154
CONCLUSÕES .....	157

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As formigas cortadeiras estão presentes na região Neotropical, ocorrendo desde os Estados Unidos (latitude 33°N) até a Argentina (latitude 33°S) (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; WEBER, 1972; SOLOMON et al., 2008). Estas formigas estão inseridas na tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae: subfamília: Myrmicinae), são os gêneros mais derivados (*Atta* e *Acromyrmex*) e possuem simbiose com um fungo que cultivam (WEBER, 1972). As larvas e alados dependem exclusivamente do fungo como alimento (MARICONI, 1970; QUINLAN e CHERRETT, 1979; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Como substrato para o crescimento de seu simbionte, as operárias utilizam material vegetal e além deste fungo elas alimentam-se com líquidos extraídos das folhas, durante a coleta e processamento deste substrato (BASS e CHERRETT, 1995; ANDRADE et al., 2002; PAUL e ROCES, 2003).

Estes insetos como eussociais apresentam sobreposição de gerações, indivíduos estéreis e reprodutivos e o cuidado cooperativo com a prole (WILSON, 1971). Com o desenvolvimento dessa unidade social, ou seja, da colônia, que é constituída por castas de indivíduos com funções próprias, ocorre um sofisticado sistema de comunicação. Este sistema controla e coordena os comportamentos dos componentes coloniais em suas mais variadas funções (SHOREY, 1973).

Os sinais químicos permitem o processo de reconhecimento entre os indivíduos (WILSON, 1971) sendo comum a todos do ninho (BRADSHAW e HOWSE 1984) e estes sinais mediam várias respostas tais como recrutamento e alarme (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990), contudo para formigas cortadeiras o conhecimento sobre esse tema ainda é escasso. Outra forma de comunicação que é observada para estes insetos é a mecânica, por estridulação, e também pouco se tem descrito para as formigas cortadeiras, mas já se sabe que esse sinal é utilizado como alarme e no forrageamento em curtas distâncias.

Deste modo, o presente estudo caracterizou tanto o perfil químico quanto sonoro de algumas espécies de *Atta* spp. e a interação das mesmas com semioquímicos presentes nas plantas, estudos estes que poderão servir de base para futuros estudos envolvendo os dois meios de comunicação tão importantes na complexa sociedade destas formigas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A. P. P. et al. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology**, Chicago, v. 40, p. 293-30, 2002.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, London, v. 20, n. 1, p. 1-6, 1995.
- BRADSHAW J.W.S., HOWSE P.E. Sociochemical of ants. In: BELL, W. J.; CARDE, R.T. (ed.). **Chemical ecology of insects**, London, Chapman and Hall, 429-473. 1984.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge: Harvard university press. p.133-154, 1990.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies**. 521p., 2009.
- MARICONI, F.A.M. **As saúvas**. Agronomia Ceres, São Paulo, 167p., 1970.
- PAUL, J.; ROCES, F. Fluid intake rates in ants correlate with their feeding habitats. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, p. 347-357, 2003.
- QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomology**, v. 4, p. 151-160, 1979.
- SHOREY H. H, Behavioral responses to insect pheromones. **Annual Review Entomology** v. 18, p. 349-380, 1973.
- SOLOMON S.E. et al. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. **PLoS ONE**, v. 3n.7, 27-38, 2008.
- WEBER, N. A. 1972. Gardening ants: the Attines. **American Philosophical Society**, Philadelphia, Pennsylvania, 548p.
- WILSON EO, 1971. **The insect societies**. Cambridge: Harvard University.548p.

**PARTE I – SEMIOQUÍMICOS em *Atta* sp.: Hidrocarbonetos cuticulares**



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desde os anos 30 foi sugerida a presença de hidrocarbonetos na cutícula dos insetos, após a invenção da cromatografia foi realizado o primeiro estudo em 1963 por BAKER em *Periplaneta americana* observando a presença de n-pentacosano, 3 metil pentacosano e z-z 6,9 heptacosadieno, compostos estes, exemplos de classes de hidrocarbonetos majoritários em insetos, os n-alcanos, metilalcanos e alcenos, respectivamente.

Nos anos 60 foi realizado um experimento com acetato possuindo um marcador provando que os hidrocarbonetos cuticulares eram biossintetizado pelos próprios insetos, considerando, portanto estes compostos como parte do genótipo do inseto podendo ser utilizados na taxonomia. A função primordial deles é a de evitar a perda de água, fato este observado desde a década de 30 e posteriormente, se descreveu a grande gama de funções dos hidrocarbonetos como reconhecimento intranidal, entre castas e até mesmo na divisão de tarefas. (BLOMQUIST e BAGNÈRES, 2010).

Para MARTIN et al. (2009) nos hidrocarbonetos cuticulares, os compostos n-alcanos são os que mais ocorrem e estão intimamente ligados no processo para evitar a perda de água dos insetos, sendo estes considerados sinais simples e a presença de dimetis é o que confere o odor colonial (MARTIN et al., 2008). Este processo de reconhecimento colonial é essencial para a manutenção e integridade dos insetos sociais (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Acredita-se que esta capacidade de reconhecimento entre companheiros de ninho seja adquirida pelo ambiente ou geneticamente (i.e BLOMQUIST e BAGNÈRES, 2010; LIANG e SILVERMAN, 2000) e este sistema é mais eficaz à medida que a colônia, em formigas cortadeiras, por exemplo, cresce em volume e número de indivíduos (BENTO, 1993).

Bento (1993) em estudos com *Atta sexdens rubropilosa* verificou a forte atratividade da rainha para as operárias de suas colônias e que a volatilidade deste feromônio é baixa, sendo que a função da rainha nas colônias tem sido descrita como produtora parcial ou total de substâncias discriminatórias que serão transferidas às operárias com o intuito da formação do odor colonial. Isto pode ocorrer em colônias iniciais, mas em colônias já estabelecidas a rainha de uma mesma espécie, colocada em outra colônia, mesmo com a rainha ausente não seria aceita no ninho já que a produção deste odor é influenciado por outros fatores, tais como alimentação.

Liang e Silverman, (2000) em estudos com a formiga argentina, *Linepithema humile* verificaram que os hidrocarbonetos cuticulares também podem ser obtidos através da alimentação e são utilizados para reconhecimento colonial. O “Gestalt” (odor colonial) é descrito como uniforme para a colônia, sendo a base do reconhecimento colonial (CROZIER e DIX, 1979), porém ele irá variar conforme a colônia, pois este odor, é formado pela interação de todos os companheiros de ninhos sujeitos a fatores externos como a alimentação.

Em *Myrmecia gulosa*, o perfil dos hidrocarbonetos varia em reprodutivos e não reprodutivos, com relação a compostos específicos de C<sub>25</sub>, em que as castas reprodutivas possuem 9-pentacoseno e 3 metilpentacoseno, compostos estes ausentes ou em baixíssima concentração (traços) para os não-reprodutivos (DIETMANN, et al. 2003). Para estes autores, o trabalho com esta formiga contradiz o “Gestat” devido a esta distinção entre castas (DIETMANN, et al. 2003).

Lucas et al. (2004), verificaram em *Pachycondyla villosa* que parte dos hidrocarbonetos cuticulares são transportados da lipoforina (carregador de hidrocarbonetos internos), ou seja, este carregador leva os hidrocarbonetos internos para a epicutícula e a outra parte é proveniente do odor colonial, sendo transmitido pelo allogrooming.

Os hidrocarbonetos cuticulares constituem a maior quantidade de metilalcanos, contudo estes são quase ausentes na glândula pós-faríngea (PPG), portanto ao descrever os hidrocarbonetos presentes na PPG observou-se que são diferentes da lipoforina. Por meio da marcação de hidrocarbonetos com isótopos e inseridos na PPG, verificou-se que nenhum hidrocarboneto foi transferido para outra parte corpórea, observando assim, que a lipoforina faz o transporte para a PPG, porém este transporte é seletivo, não levando metilalcanos para este local, pois como já mencionado verificou que esta classe de hidrocarbonetos está presente tanto na epicutícula quanto na lipoforina (LUCAS et al. 2002).

Sugere-se que por self-grooming ocorre a via de transporte de hidrocarboneto do corpo para a PPG. Já para os hidrocarbonetos que são comuns aos companheiros de ninho esta distribuição ocorre por contato físico entre os companheiros de ninhos e são mais importantes do que o allogrooming (SOROKER et al. 2003).

Assim, dependendo da região corpórea os hidrocarbonetos podem variar, em estudos com *Pachycondyla apicalis* em relação a composição de hidrocarbonetos das pernas anteriores, onde está presente um esporão que contém elevadas quantidades de

hidrocarbonetos e da glândula pós-faríngea, quando a formiga não possuía contato com as pernas e os esporões, observou um aumento significativo dos hidrocarbonetos nas pernas e uma diminuição nas glândulas e após 24 horas em condições normais as concentrações voltavam a estabilizar. Com isso, foi possível observar que os esporões é um local de acumulação de hidrocarbonetos e que a glândula recebe um abastecimento dos mesmos durante a alimentação e o self-grooming (HEFETZ, et al. 2001). A PPG também está associada como fonte de possíveis sinais de reconhecimento colonial (BAGNÈRES e MORGAN, 1991; SOROKER et al., 1995a).

Uma revisão minuciosa de todos os trabalhos publicados com formigas foi realizada por Martin et al. (2009). Para cinco subfamílias (Formicinae, Nothomyrmecinae, Dolichoderinae, Poneriinae e Myrmicinae) em 78 espécies, tanto para hidrocarbonetos cuticulares quanto glandulares, os autores constataram que os compostos são específicos para cada espécie. No entanto, para estes autores os hidrocarbonetos não podem ser utilizados para a filogenia, pois a produção de hidrocarbonetos complexos já ocorre nos indivíduos mais primitivos, por isso eles sugerem que a arquitetura genética para produzir uma diversidade de hidrocarbonetos já era presente antes da diversificação das espécies.

Do ponto de vista taxonômico os hidrocarbonetos cuticulares trouxeram várias contribuições para a taxonomia de formigas como já mencionado neste texto, no gênero *Solenopsis*, grupo oriundo da América do Sul que foi introduzido nos Estados Unidos e Austrália, pela análise do perfil químico se distinguiu duas espécies: *Solenopsis richteri* e *Solenopsis invicta* (NELSON, 1980). Além disso, um híbrido destas espécies pode produzir um perfil intermediário entre elas (VANDER MEER, LOFGREN e ALVARES, 1985). Em saúvas a última atualização do gênero foi em 1959 (BORGMEIER, 1959), talvez pela análise do perfil seja possível auxiliar a revisão da identificação destas formigas.

Em formigas cortadeiras, estudos de Nascimento et al. (1993) dos compostos presentes na glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* associados ao modelo de castas proposto por WILSON, 1980, os autores verificaram que ocorre o agrupamento dos compostos de acordo com as castas. As operárias que vivem dentro do ninho possuem 4-metil-3-heptanona e as forrageiras e soldados que saem a campo possuem como característico na glândula mandibular, um feromônio baseado em citral.

Para Hernández et al. (2002) em *Atta laevigata* o reconhecimento entre companheiros de ninho se dá por sinais químicos presentes na cabeça, e estes compostos são provenientes provavelmente da glândula mandibular e são distribuídos por toda a epicutícula, no entanto,

em bioensaios contendo extratos da glândula mandibular e da PPG, verificaram que esta última foi responsável efetivamente pelo reconhecimento colonial, sendo que a PPG foi caracterizada por alcanos de cadeias maiores e poucos voláteis, o oposto foi obtido para a glândula mandibular. Compostos químicos também foram caracterizados para *A. colombica* e *Acromyrmex subterraneus* (MARTIN e MACCONNEL, 1970; RICHARD et al. 2004).

Sendo assim, mais estudos sobre compostos químicos, principalmente os cuticulares, que foram pouco enfatizados para o gênero *Atta* são importantes nestes insetos sociais em que sua sociedade é basicamente mediada por sinais químicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGNÈRES A.G., MORGAN E.D. The postpharyngeal glands and the cuticle of Formicidae contain the same characteristic hydrocarbons. **Experientia** v. 47, p. 106– 111, 1991.
- BAKER, G.L.; VROMAN, H.E.; PADMORE, J. 1963. Hydrocarbons of the American cockroach. **Biochemical Biophysical Research Communications** v.13, p.360–365, 1963.
- BENTO, J.M.S. **Condições climáticas para o voo nupcial e reconhecimento dos indivíduos em *Atta sexdens rubropilosa*** (Hymenoptera: Formicidae). Dissertação (Mestrado em Entomologia) Universidade Federal de Viçosa, 99 p., 1993.
- BLOMQUIST e BAGNÈRES, 2010. **Insect Hydrocabons**. Cambridge University Press, 492p., 2010.
- BORGMEIER, T. Revision der Gattung *Atta* Fabricius Hymenoptera, Formicidae). **Studia Entomologica** v. 22, p. 321–390, 1959.
- CROZIER, R. H; DIX M. W. Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social *Hymenoptera*. **Behaviour Ecology and Sociobiology** v. 4, p.217–224, 1979.
- DIETMANN et al. Cuticular hydrocarbons mediate discrimination of reproductives and nonreproductives in the ant *Myrmecia gulosa* **Evolution** v.100, n.18, p.10341-10346, 2003.
- HEFETZ, A. et al. The front basitarsal brush in *Pachycondyla apicalis* and its role in hydrocarbon circulation. **Chemoecology** v.11, p.17-24, 2001.
- HERNANDÉZ, J.V.; LÓPEZ, H.; JAFFE, K. Nestmate recognition signals of the leaf-cutting ant *Atta laevigata* **Journal of Insect Physiology** v. 48, p.287-295. 2002.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge: Harvard university press. p.133-154, 1990.

- 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.
- LUCAS C. et al. Etude des bases chimiques et comportementales de la formation du “visa” colonial chez les Ponérines du genre *Pachycondyla*, **Biologie du comportement**. Université Paris-Sud, Orsay, p. 158, 2002.
- LUCAS C. et al. Hydrocarbon circulation and colonial signature in *Pachycondyla villosa*. **Journal of Insect Physiology** v. 50, p.595-607, 2004.
- MARTIN, S. J. et al. Evolution of species-specific cuticular hydrocarbon patterns in *Formica* ants. **Biological Journal Linnean Society** v. 95, p. 131–140, 2008.
- MARTIN et al. A Review of Ant Cuticular Hydrocarbons. **Journal Chemical Ecology** v. 35, p.1151–1161, 2009.
- MARTIN, M.M. e MACCONNEL, J.G. 1970 The alkenes of the ant *Atta colombica*. **Tetrahedron** v. 26, p. 307–319, 1970.
- NASCIMENTO et al. Variation with caste of the mandibular gland secretion in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Journal Chemical Ecology**, v. 19, n.5, p.907-918, 1993.
- NELSON, et al. Re-analysis of the cuticular methylalkanes of *Solenopsis invicta* e *Solenopsis richteri*. **Insect Biochemistry** v.10, 409-418. 1980.
- RICHARD, F.E. et al. Food influence on colonial recognition and chemical signature between nestmates in the fungus growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. **Chemoecology** v.14, p.9-16, 2004.
- SOROKER V. et al. Structural and chemical ontogeny of the postpharyngeal gland in the desert ant *Cataglyphis niger*. **Physiology Entomology** v. 20, p.323–329, 1995a.
- SOROKER et al. The significance of within-group hydrocarbons distribution for workers of *Pachycondyla apicalis*. **Insectes Sociaux** v.50, p.212-217, 2003.
- VANDER MEER, R.K.; LOFGREN, C.S.; ALVARES, F.M. Biochemical evidence for hybridization in fire ants. **Florida Entomologist** v.68, p.501-502. 1985.

**Identificação das castas temporárias de *Atta capiguara*, *Atta laevigata*, *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* pelo perfil de hidrocarbonetos cuticulares (Hymenoptera: Formicidae).**

**Resumo**

Os hidrocarbonetos cuticulares são específicos para cada espécie, sendo assim utilizados para a taxonomia. No gênero *Atta* existe uma dificuldade na identificação das espécies em ninhos iniciais e além do mais a revisão deste grupo está desatualizada. Pensando nisso, este trabalho propôs utilizar os hidrocarbonetos cuticulares como ferramenta para a identificação de castas temporárias de quatro espécies: *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta capiguara* e *Atta bisphaerica*. As formigas foram imersas em hexano e as amostras analisadas por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas. Verificou-se uma grande diversidade de compostos, variando de C<sub>23</sub> a C<sub>35</sub>, sendo maior o número de sinais em fêmeas do que machos. Por meio destes compostos foi possível fazer a separação das espécies sendo os alcanos comuns a todas. Em *Atta capiguara* a complexidade de compostos foi evidente, a única que contém alcadienos e apresentou também os ramificados: metilalcanos e dimetilalcanos, compostos estes característicos em *Atta laevigata*. Em *Atta bisphaerica* diferentes isômeros dos insaturados foram os majoritários e para *Atta sexdens rubropilosa* se observa um número maior de picos quando comparado com as outras três, além da presença de trimetilalcanos. Com os hidrocarbonetos analisados foi possível também inferir sobre relações filogenéticas deste grupo sendo similar ao que já foi descrito na literatura. Assim, os hidrocarbonetos cuticulares presente nas espécies analisadas foram instrumentos eficientes para a separação das mesmas, para as duas castas analisadas e podem ser utilizados para auxiliar na construção da filogenia do grupo.

**Palavras chave:** *Atta*, hidrocarbonetos cuticulares.

### 1.1.1 Introdução

O corpo dos insetos é recoberto por uma fina camada de cera que constitui a epicutícula, camada esta que não possui quitina e é constituída principalmente por hidrocarbonetos: compostos formados por cadeias de carbono e hidrogênio. A função primária de tais compostos é atribuída à proteção contra a perda de água através da parede corporal e secundariamente passou a ter também um importante papel na comunicação (LOCKEY, 1988; HOWARD E BLOMQUIST, 2005; TRIPLEHORN e JOHNSON, 2011). Estes compostos associados à cutícula são classificados como feromônios de contato, uma vez que pela baixa volatilidade necessitam do contato com a antena para a sua percepção (OZAKI et al., 2005). As informações transmitidas através dos hidrocarbonetos são amplas, sendo elas responsáveis pelo reconhecimento de companheiros de ninho, sinalizadores de castas, tarefa, sexo, ativação ovariana, dentre outras (HOWARD E BLOMQUIST, 2005). Por se tratar de compostos espécie-específicos estas substâncias tem sido amplamente utilizadas também na taxonomia e sistemática filogenética (MARTIN et al., 2008).

Em formigas foram descritas mais de 700 compostos, um número alto quando comparado com insetos não sociais, que varia de 20 a 50 compostos (MARTIN et al., 2008). Em sete espécies de *Cataglyphis*, por exemplo, na glândula pós faríngea foram descritos 241 compostos, variando de C<sub>13</sub> a C<sub>35</sub> (DAHBI et al., 1996). Em estudos com treze espécies simpátricas de *Formica* sp. da Finlândia, juntamente com um subconjunto de cinco espécies das Ilhas Britânicas, foram verificados quase 100 compostos, sendo eles alcanos, alcenos, mono-metil alcanos ou dimetil alcanos, com uma especificidade dos hidrocarbonetos cuticulares por espécie e os mesmos permaneceram estáveis e não foram influenciados por fatores ecológicos, como solo e vegetação (MARTIN et al., 2008).

A identificação das diferentes espécies de *Atta* spp. são realizadas por meio do exame morfológico da cabeça dos soldados presentes nestas colônias. As chaves de identificação são baseadas nestas operárias de tamanho máximo, casta responsável pela defesa colonial e com a largura da cabeça maior que 3.0 mm (BOARETTO e FORTI, 1997). Porém para que esta identificação seja possível, a colônia deve atingir uma determinada maturidade, aproximadamente 40 meses, que é quando observa-se a presença destas castas (BOARETTO e FORTI, 1997; AUTORI, 1942 apud MOREIRA, 2013; GONÇALVES, 1960).



Visualmente, as castas temporárias (machos e fêmeas aladas) de *Atta* spp. morfologicamente não diferem entre espécies e, em algumas delas (i.e. *Atta mexicana*, *Atta insularis* e *A. mexicana*), a única diferença morfológica descrita encontra-se na genitália dos machos. Além disso, existe uma grande dificuldade em se obter tal material, haja vista a irregularidade dos voos nupciais e também a dificuldade de se escavar ninhos maduros (EMERY, 1913 apud BACCI Jr. et al., 2009; GONÇALVES, 1960; MOSER et al., 2004; MOREIRA et al., 2001; MOREIRA et al., 2004). Portanto, a caracterização química é uma potencial ferramenta para a diferenciação entre as espécies, além da possibilidade de inferir suas possíveis relações, contribuindo desta forma para a revisão taxonômica do gênero, o qual se encontra desatualizado (BORGMEIER, 1959).

Outro ponto a ser ressaltado é o momento da revoada descrito na literatura que ocorre concomitantemente para as espécies de *Atta*, menos para *A. bisphaerica*, pois esta revoa no período diurno e as outras no final da tarde (BENTO, 1993; MOREIRA, 2013). Em insetos, já se sabe que hidrocarbonetos cuticulares são conhecidos por atuar também como feromônios sexuais e permitem o reconhecimento de companheiros coespecíficos, como por exemplo, em cinco espécies de besouros que ocorrem na mesma posição geográfica, verificou-se que os compostos majoritários diferem entre as fêmeas virgens e atraem machos apenas da mesma espécie (FLETCHER, 2008). Além disso, visto que tais compostos carregam informações sobre a colônia de origem e são os responsáveis pela discriminação entre companheiros e não-companheiros de ninhos (HOWARD e BLOMQUIST, 2005; NUNES et al. 2008.).

Como o perfil de compostos cuticulares em formigas cortadeiras ainda é desconhecido, a descrição da constituição cuticular do gênero *Atta* é o primeiro passo para o estudo da sua diversidade química. Assim, os estudos taxonômicos e inferências sobre a posição filogenética entre as espécies de *Atta* seriam amplamente beneficiados com o uso de caracteres químicos cuticulares fornecendo ainda bases para futuras investigações do papel desses compostos na comunicação intra e internidal.

Deste modo, o objetivo do presente estudo foi descrever a diversidade química cuticular de quatro espécies do gênero *Atta*, testar a espécie-especificidade destes compostos e verificar diferenças entre os sexuais das seguintes espécies: *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta capiguara* e *Atta bisphaerica*.

### 1.1.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Centro de estudos de Insetos Sociais da Universidade Estadual Paulista (UNESP - Rio Claro) e a coleta dos alados foram efetuadas em quatro cidades (Tabela 1) em 2010. Os indivíduos foram coletados na entrada do ninho, na pré-revoada (Figura 1) e acondicionados em frascos herméticos separadamente para posterior análise em laboratório.

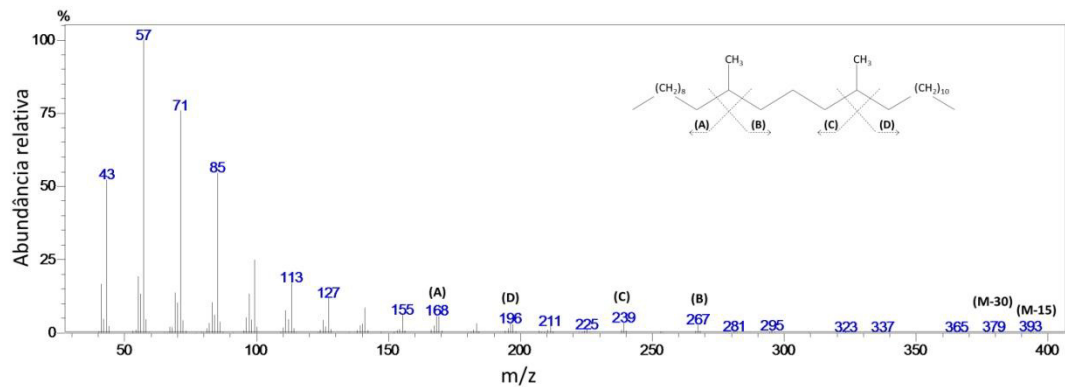
As castas reprodutivas tiveram suas asas cortadas e foram imersas em 5 mL de Hexano pelo período de 90 segundos, com intervalos de 5 segundos a cada 30 segundos. As amostras foram analisadas por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), Shimadzu. Para as análise no CGEM utilizou-se uma coluna DB-5 (30 m X 0,25 mm), o protocolo de temperatura do cromatógrafo utilizado foi: 80 °C/2min, 12°C/min, 300 °C durante 20 minutos. A temperatura do injetor foi de 320 °C e do detector de 80 °C. Os dados foram analisados pelo software LabSolution CGMSolution Versão 2.53 SU1. A identificação dos compostos foi realizada através da análise das fragmentações representada pelo espectro de massas (Figura 2), além de comparação com compostos padrão e ions diagnósticos já descritos na literatura. As posições das ligações duplas em alcanos e alcadienos não foram descritas. A abundância relativa de cada hidrocarboneto identificado foi mensurada com base na área sob o pico. Os dados foram submetidos à Análise dos Componentes Principais (PCA).

**Tabela 1.** Alados de *Atta* sp. coletados para identificação de hidrocarbonetos cuticulares.

Espécie	Cidades amostradas	Nº de indivíduos amostrados	Nº dos ninhos amostrados
		Machos/ Fêmeas	
<i>A.laevigata</i>	Botucatu	5/5	N1
		5/5	N2
	Bauru	5/5	N3
		5/5	N4
<i>A.capiguara</i>	Botucatu	5/5	N1
		5/5	N2
<i>A.bisphaerica</i>	Botucatu	5/1	N1
		5/5	N2
	Rio Claro	5/5	N3
<i>A.sexdens rubropilosa</i>	Rio Claro	5/5	N1
	Rio Claro	5/5	N2
	Bauru	5/5	N3
	Botucatu	5/5	N4
	Botucatu	5/5	N5
	São Carlos	5/5	N6
	São Carlos	5/5	N7



**Figura 1.** Pré-revoada de *A. sexdens rubropilosa* em Botucatu-SP.



**Figura 2.** Espectro de massas indicando o padrão de fragmentação do alcano ramificado 11,15-dimetilheptacosano presente na cutícula de fêmeas de *Atta laevigata*.

### 1.1.3 Resultados

Uma diversidade de hidrocarbonetos cuticulares foi encontrada para as quatro espécies de *Atta*. O perfil químico variou de C<sub>23</sub> a C<sub>35</sub>, sendo a diversidade maior nas fêmeas não fecundadas do que em machos (Tabelas 2 a 5). Em fêmeas não fecundadas foram encontrados: 47 compostos em *Atta sexdens rubropilosa*, 42 em *A. capiguara*, 33 para *A. bisphaerica* e 34 em *A. laevigata*. Já para machos, 19, 19, 21 e 34 compostos identificados em *A. capiguara*, *A. bisphaerica*, *A. laevigata* e *A. sexdens rubropilosa*, respectivamente. Por meio da técnica utilizada para a extração dos hidrocarbonetos de machos e fêmeas verificou-se sinais cromatográficos bem evidentes permitindo a caracterização por análise dos espectros, como por exemplo, já demonstrado na Figura 2.

O perfil químico cuticular dos indivíduos analisados apresentou claras diferenças entre as espécies (Figura 3 e 4). As diferenças encontradas foram tanto qualitativas quanto quantitativas nos compostos comuns. Em algumas das espécies essa diferença se encontra em toda a classe de compostos.

A cutícula de *Atta bisphaerica* é composta apenas de alcanos lineares e diferentes isômeros de alcenos (Tabela 2). *A. laevigata* apresentou quase total ausência de compostos insaturados e apresentou uma grande diversidade de hidrocarbonetos ramificados sendo esses metis e dimetis (Figura 2; Tabela 3). Dentre as espécies estudadas, *A. capiguara* apresentou a maior complexidade de compostos com relação à classe de compostos presentes, sendo encontrados alcanos lineares, ramificados metis e dimetis e insaturados alcenos e alcadienos (Tabela 4).

O perfil cuticular de *Atta sexdens rubropilosa* é composto tanto por alcanos lineares bem como alcanos ramificados (Tabela 5). Os compostos majoritários desta espécie foram trimetilalcanos. A correta identificação de trimetilalcanos não pode ser realizada baseando-se apenas do padrão de quebra das moléculas (i.e. espectro de massas) necessitando de técnicas específicas de química orgânica. Dessa forma, os picos foram quantificados e a maior parte dos compostos citados como “não identificados” na Tabela 5. Os trimetilalcanos identificados foram baseados nas descrições realizadas por Martin e Macconel, (1970) e as possíveis quebras para esses compostos confirmadas por meio do espectro de massas.

**Tabela 2.** Média e desvio padrão da concentração relativa dos compostos cuticulares identificados em alados de *Atta bisphaerica*.

Pico	TR	Composto	Fêmea		Machos	
			Media	DP	Media	DP
1	14.48	Tricoseno	<i>Traços</i>		0	
2	14.65	Tricosano	0.4	± 0.1	0	
3	14.88	Tetracoseno	<i>Traços</i>		0	
4	15.18	Tetracoseno	<i>Traços</i>		0.2	± 0.4
5	15.33	Tetracosano	0.2	± 0.1	0.3	± 0.2
6	15.57	Pentacoseno	0.2	± 0.2	0	
7	15.86	Pentacoseno	8.6	± 3.8	7.4	± 5.1
8	15.90	Pentacoseno	0.2	± 0.1	0	
9	16.00	Pentacosano	5.3	± 0.8	6.5	± 1.5
10	16.49	Hexacoseno	0.7	± 0.4	0.3	± 0.3
11	16.63	Hexacosano	0.6	± 0.1	1.0	± 0.3
12	17.07	Heptacoseno	1.3	± 0.8	1.2	± 1.0
13	17.13	Heptacoseno	16.1	± 6.8	12.4	± 7.8
14	17.18	Heptacoseno	0.7	± 0.3	0.6	± 0.4
15	17.25	Heptacosano	6.4	± 1.5	16.5	± 4.1
16	17.65	Octacoseno	<i>Traços</i>		0	
17	17.72	Octacoseno	0.8	± 0.4	0	
18	17.83	Octacosano	0.4	± 0.1	1.0	± 0.3
19	18.22	Nonacoseno	0.5	± 0.4	0	
20	18.31	Nonacoseno	23.0	± 3.0	5.8	± 6.3
21	18.41	Nonacosano	5.9	± 2.7	21.5	± 8.7
22	18.82	Triacoteno	0.2	± 0.2	0	
23	18.90	Triacoteno	0.8	± 0.2	0	
24	19.01	Triacotano	0.2	± 0.1	0.5	± 0.3
25	19.48	Hentriacoteno	<i>Traços</i>		-	
26	19.59	Hentriacoteno	21.1	± 7.1	8.5	± 4.5
27	19.70	Hentriacotano	3.3	± 2.1	12.6	± 8.2
28	20.01	Dotriacoteno	<i>Traços</i>		0	
29	20.23	Dotriacoteno	0.2	± 0.1	0	
30	20.33	Dotriacotano	0.3	± 0.1	0.1	± 0.1
31	21.12	Tritriacoteno	0.3	± 0.8	0	
32	21.23	Tritriacoteno	1.5	± 1.2	1.4	± 1.2
33	21.40	Tritriacotano	0.3	± 0.3	2.3	± 1.8

**Legenda:** *Traços* – concentração relativa média inferior a 0,2%.

**Tabela 3.** Média e desvio padrão da concentração relativa dos compostos cuticulares identificados em alados de *Atta capiguara*.

Pico	TR	Composto	Fêmea		Macho	
			Média	DP	Média	DP
1	14.35	Tricoseno	<i>Traços</i>		0	
2	14.50	Tricoseno	<i>Traços</i>		0	
3	14.65	Tricosano	<i>Traços</i>		0.2 ± 0.1	
4	15.24	Tetracosano	<i>Traços</i>		0	
5	15.59	Pentacoseno	<i>Traços</i>		0	
6	16.00	Pentacosano	0.2 ± 0.2		0.6 ± 0.1	
7	16.25	Hexacoseno	<i>Traços</i>		0	
8	16.67	Hexacosano	0.2 ± 0.2		0.2 ± 0.1	
9	16.89	Heptacoseno	1.3 ± 2.3		0	
10	17.25	Heptacosano	2.0 ± 1.9		6.7 ± 2.0	
11	17.46	9 e 11-Metilheptacosano	1.3 ± 3.3		0.2 ± 0.1	
12	17.85	Octacosano	0.2 ± 0.2		0.7 ± 0.2	
13	18.03	12-Metiloctacosano	0.2 ± 0.3		0	
14	18.31	Nonacoseno	0.4 ± 1.1		0	
15	18.42	Nonacosano	2.4 ± 1.5		8.8 ± 2.1	
16	18.60	11 e 13 e 15-Metilnonacosano	2.0 ± 0.8		6.0 ± 1.5	
17	18.70	11, 15-Dimetilnonacosano	1.0 ± 0.8		2.1 ± 0.3	
18	18.83	12, 16-Dimetilnonacosano	0.3 ± 0.3		0	
19	19.03	Triacotano	0.2 ± 0.1		0.5 ± 0.2	
20	19.06	<i>Não identificado</i>	0.3 ± 0.7		0	
21	19.23	12 e 15-Metiltriacontano	2.4 ± 1.2		0	
22	19.40	12, 16-Dimetiltriacontano	1.3 ± 1.0		0	
23	19.51	Hentriaconteno	1.0 ± 1.7		0	
24	19.60	Hentriaconteno	3.7 ± 2.0		5.6 ± 1.6	
25	19.72	Hentriacontano	5.5 ± 3.0		9.1 ± 3.1	
26	19.98	11 e 13 e 15-Metilhentriacontano	11.5 ± 10.5		30.2 ± 9.7	
27	20.16	13, 17-Dimetilhentriacontano	9.8 ± 6.2		0	
28	20.26	7,20-Dimetilhentriacontano	5.0 ± 5.6		0	
29	20.34	<i>Não identificado</i>	0.8 ± 0.6		0	
30	20.55	Dotriacontano	1.3 ± 1.1		0	
31	20.77	12 e 14 e 16-Metildotriacontano	4.5 ± 2.9		0	
32	21.01	12, 18-Dimetildotriacontano	2.5 ± 2.2		0	
33	21.08	Tritriacontadieno	1.7 ± 1.4		0	
34	21.15	Tritriaconteno	2.8 ± 4.5		0.9 ± 0.6	
35	21.29	Tritriaconteno	10.1 ± 6.5		8.5 ± 5.0	
36	21.43	Tritriacontano	6.1 ± 2.9		4.9 ± 2.8	
37	21.77	13 e 15 e 17-Metiltritriacontano	9.7 ± 4.6		9.8 ± 3.1	
38	22.00	Dimetiltritriacontano °	3.9 ± 2.8		0	
39	23.26	Pentatriacontadieno	2.0 ± 2.1		0	
40	23.34	Pentatriacontadieno	0.6 ± 0.4		0	
41	23.47	Pentatriaconteno	0.5 ± 0.5		2.7 ± 2.0	
42	23.61	Pentatriacontano	0.9 ± 0.6		1.0 ± 1.1	

**Legenda:** TR- tempo de retenção dos compostos; *Traços* – concentração relativa inferior a 0,2%.; ° - posição das ramificações não identificadas

**Tabela 4.** Média e desvio padrão da concentração relativa dos compostos cuticulares identificados em alados de *Atta laevigata*.

Pico	TR	Composto	Fêmeas			Machos		
			Média	DP		Média	DP	
1	14.50	Tricoseno	0.2	± 0.5		0		
2	14.68	Tricosano	1.3	± 0.7		2.5	± 1.3	
3	14.91	9 e 11-Metiltricosano	0.5	± 0.6		0		
4	14.95	7-Metiltricosano	0.2	± 0.4		0		
5	15.34	Tetracosano	1.2	± 0.7		1.9	± 1.4	
6	15.59	9 e 11-Metiltetracosano	0.9	± 0.7		0		
7	15.62	7-Metiltetracosano	0.3	± 0.4		0		
8	16.00	Pentacosano	4.7	± 3.4		8.6	± 5.1	
9	16.23	9 e 11 e 13-Metilpentacosano	6.0	± 2.3		5.1	± 2.1	
10	16.27	7-Metilpentacosano	0.9	± 0.5		0		
11	16.40	9, 15-Dimetilpentacosano	0.5	± 0.6		0		
12	16.45	7, 14-Dimetilpentacosano	0.7	± 0.6		0		
13	16.64	Hexacosano	2.6	± 1.4		3.2	± 1.5	
14	16.86	9 e 11 e 15-Metilhexacosano	7.8	± 2.4		6.4	± 3.2	
15	16.90	7-Metilhexacosano	0.6	± 0.4		0		
16	17.03	12,13-Dimetilhexacosano	1.7	± 0.9		0		
17	17.07	7, 15-Dimetilhexacosano	1.3	± 0.6		0		
18	17.26	Heptacosano	6.8	± 5.0		12.4	± 8.5	
19	17.46	9 e 11 e 13-Metilheptacosano	14.7	± 3.3		15.3	± 8.1	
20	17.54	Metilheptacosano*	0.8	± 0.5		0		
21	17.63	11, 15-Dimetilheptacosano	9.9	± 2.7		8.3	± 4.1	
22	17.68	7, 16-Dimetilheptacosano	2.0	± 1.3		0		
23	17.80	Dimetilheptacosano*	0.3	± 0.6		0		
24	17.85	Octacosano	1.2	± 0.8		1.5	± 1.4	
25	18.03	11 e 13 e 14-Metiloctacosano	5.5	± 2.7		4.0	± 2.2	
26	18.20	11, 15-Dimetiloctacosano	6.6	± 2.3		4.3	± 2.3	
27	18.25	Dimetiloctacosano*	0.5	± 0.3		0		
28	18.30	Nonacosano	0			0.4	± 0.8	
29	18.42	Nonacosano	5.7	± 4.1		7.8	± 5.2	
30	18.60	11 e 13 e 15-Metilnonacosano	3.4	± 3.2		3.0	± 1.3	
31	18.70	11,15-Dimetilnonacosano	7.8	± 3.7		5.2	± 2.8	
32	18.84	12,16-Dimetilnonacosano	0.7	± 0.9		0		
33	19.93	<i>Não identificado</i>	0.4	± 0.5		0		
34	19.02	Triacotano	2.0	± 2.2		0.8	± 1.2	
35	19.40	<i>Não identificado</i>	0.3	± 0.7		0		
36	19.58	Hentriacontano	0			0.9	± 1.2	
37	19.70	Hentriacontano	0			3.5	± 2.3	
38	19.90	11,15-Metilhentriacontano	0			1.3	± 1.7	
39	20.12	Metilhentriacontano*	0			2.2	± 2.5	
40	21.43	<i>Não identificado</i>	0			1.3	± 2.0	

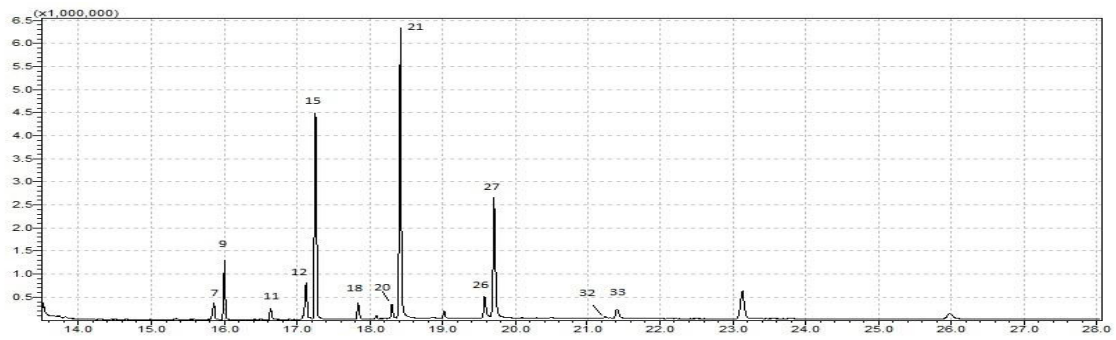
**Legenda:** TR- tempo de retenção dos compostos; \*- posição da ramificação não determinada.



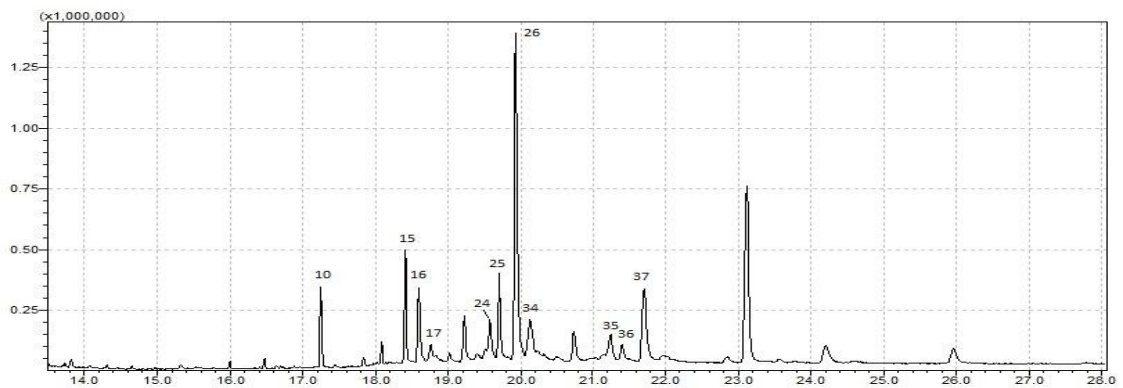
**Tabela 5.** Média e desvio padrão da concentração relativa dos compostos cuticulares identificados em alados de *Atta sexdens rubropilosa*.

Pico	TR	Compostos	Fêmea		Macho	
			Média	DP	Média	DP
1	13.80	<i>Alcano ramificado não identificado</i>		<i>Traços</i>		-
2	14.65	Tricosano		<i>Traços</i>		<i>Traços</i>
3	15.32	Tetracosano		<i>Traços</i>		0.2 ± 0.3
4	15.99	Pentacosano	0.6	± 0.5		1.8 ± 1.5
5	16.63	Hexacosano	0.2	± 0.1		0.2 ± 0.2
6	17.11	Heptacosano		0		<i>Traços</i>
7	17.24	Heptacosano	4.3	± 2.2		4.8 ± 3.9
8	17.59	<i>Alcano ramificado não identificado</i>		<i>Traços</i>		0
9	17.83	Octacosano	0.6	± 0.9		0.5 ± 0.3
10	18.30	Nonacosano		0		0.2 ± 0.5
11	18.40	Nonacosano	3.3	± 2.0		5.3 ± 2.9
12	18.96	Triacotano	0.2	± 0.1		0.2 ± 0.2
13	19.25	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.5	± 0.2		0.5 ± 0.5
14	19.41	13-Metiltriacontano	1.7	± 0.9		0.7 ± 0.4
15	19.50	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.1	± 0.1		0
16	19.61	Hentriaconteno	0.2	± 0.4		0.5 ± 0.9
17	19.68	Hentriacontano	0.8	± 0.4		2.1 ± 1.7
18	19.81	13-Metilhentriacontano	1.2	± 0.6		0.9 ± 0.8
19	19.99	4, 8, 12-Trimetilhentriacontano	2.7	± 1.3		1.2 ± 0.7
20	20.21	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.5	± 0.7		0.8 ± 1.4
21	20.40	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.5	± 0.2		0
22	20.52	Dotriacontano	0.6	± 0.5		0.5 ± 1.2
23	20.61	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.3	± 0.3		0
24	20.81	3, 7, 11-Trimetilhentriacontano	9.3	± 3.2		11.3 ± 4.5
25	21.02	3, 7, 11-Trimetildotriacontano	6.8	± 2.6		4.6 ± 1.2
26	21.14	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.5	± 0.4		0.6 ± 0.7
27	21.31	<i>Alcano ramificado não identificado</i>		0		0.7 ± 1.2
28	21.38	Tritriacontano	3.4	± 1.3		4.1 ± 3.1
29	21.59	4, 8, 12-Trimetildotriacontano	13.5	± 6.6		13.7 ± 8.0
30	21.81	4, 8, 12-Trimetiltritriacontano	8.0	± 2.7		5.7 ± 4.5
31	22.01	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	3.8	± 7.2		0
32	22.11	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.7	± 1.4		0
33	22.26	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.5	± 0.6		0
34	22.37	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	1.1	± 0.7		0
35	22.54	Tetratriacontano	3.9	± 0.7		5.1 ± 3.3
36	22.67	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.5	± 0.3		0
37	22.80	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	1.2	± 2.0		0
38	22.93	3, 7, 11-Trimetiltritriacontano	5.2	± 2.3		7.9 ± 2.4
39	23.23	3, 7, 11-Trimetiltetratriacontano	6.0	± 2.2		7.2 ± 7.3
40	23.41	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.7	± 0.7		1.5 ± 1.8
41	23.57	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.3	± 0.3		0
42	23.72	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	2.4	± 0.8		3.4 ± 2.0
43	24.00	4, 8, 12-Trimetiltetratriacontano	4.3	± 1.4		4.1 ± 2.0
44	24.31	4, 8, 12-Trimetilpentatriacontano	3.7	± 1.4		4.7 ± 5.4
45	25.14	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.3	± 0.3		0
46	25.38	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.6	± 0.7		0
47	25.95	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	1.3	± 0.7		2.6 ± 1.6
48	26.35	3, 7, 11-trimetilhexatriacontano	1.1	± 0.4		1.4 ± 1.4
49	27.49	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.4	± 0.2		0
50	27.93	<i>Alcano ramificado não identificado</i>	0.3	± 0.2		0

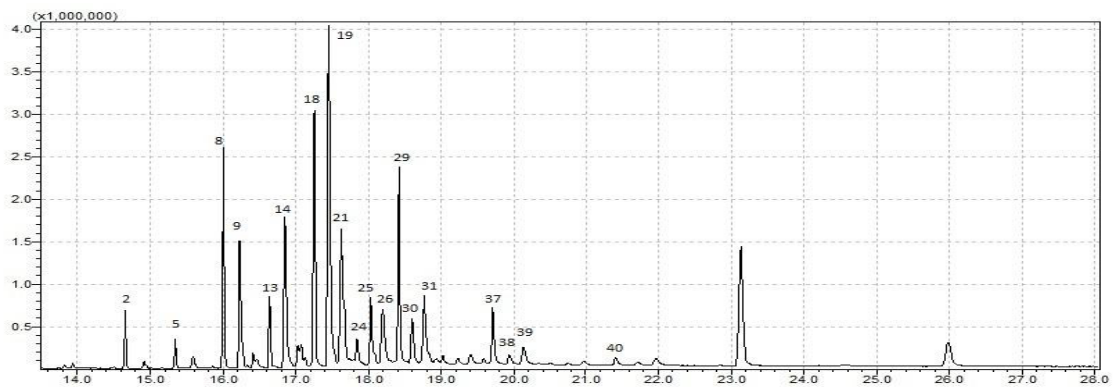
**Legenda:** TR- tempo de retenção dos compostos; *Traços*- compostos com concentração relativa menor que 0,2%.



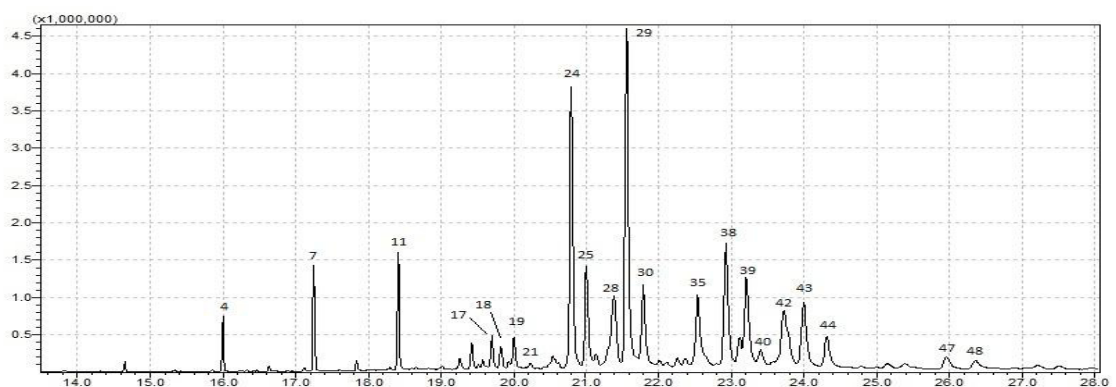
(a)



(b)

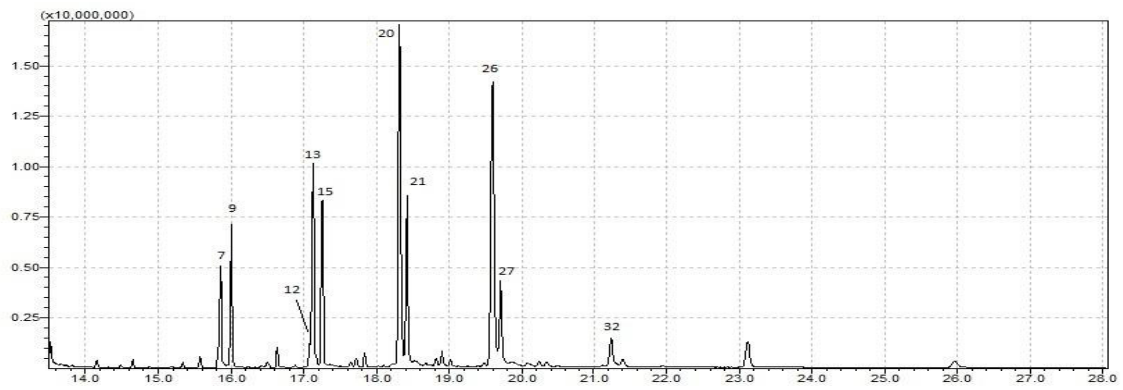


(c)

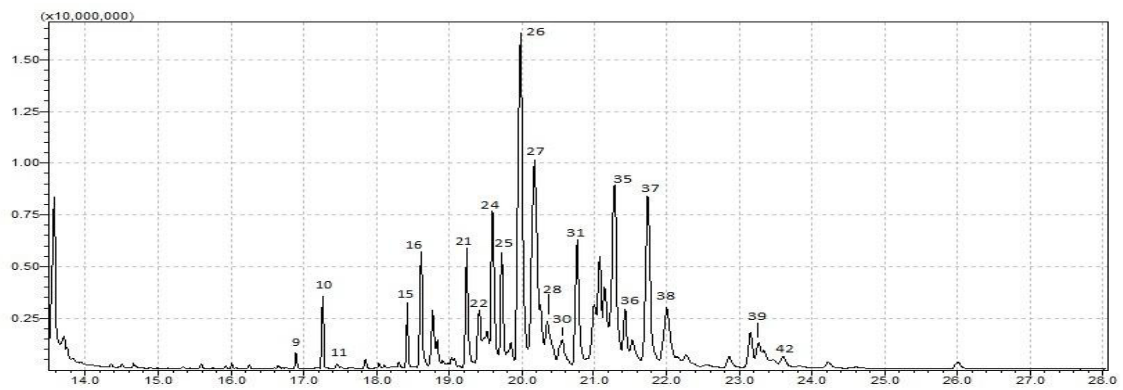


(d)

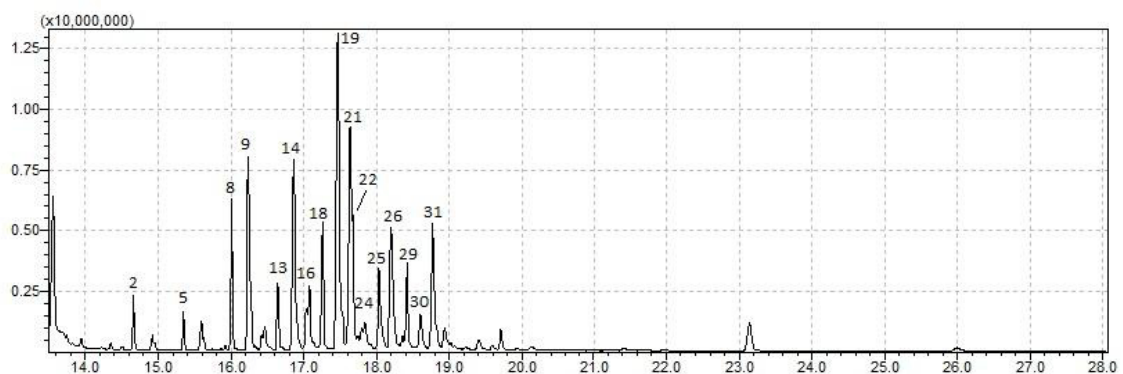
**Figura 3.** Espectros de hidrocarbonetos cuticulares de machos de *Atta bisphaerica* (a), *Atta capiguara* (b), *Atta laevigata* (c) e *Atta sexdens rubropilosa* (d). Número de picos indicados nas tabelas 2 a 5 dependendo da espécie. Alguns picos com áreas relativas altas não foram numerados por se tratarem de contaminantes e não constam nas tabelas.



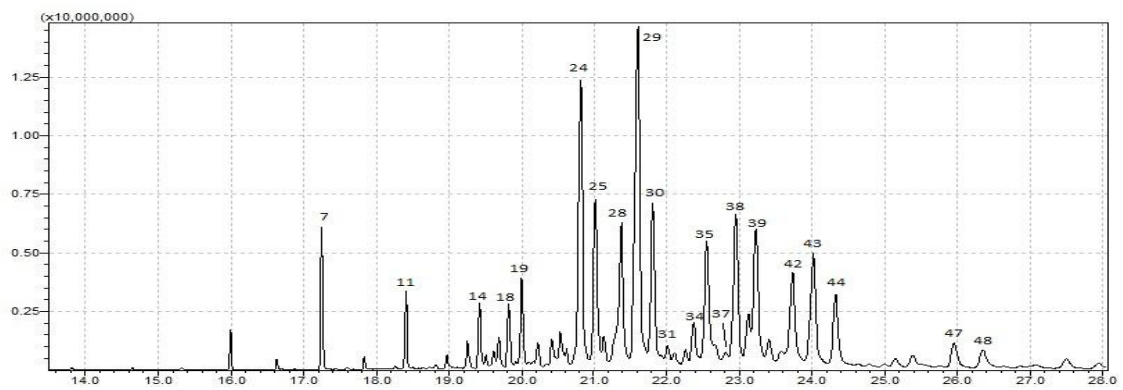
(a)



(b)



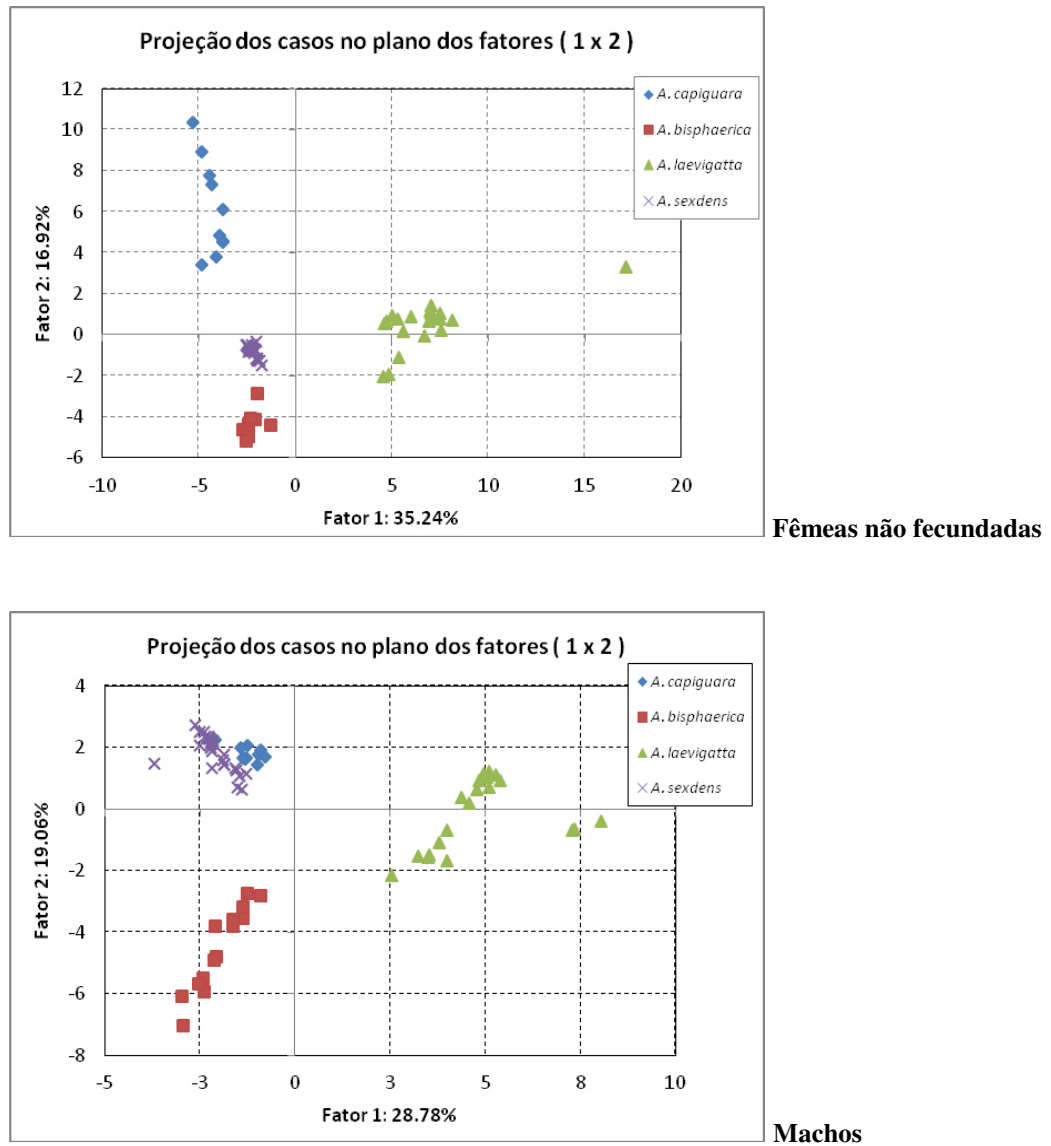
(c)



(d)

**Figura 4.** Espectros de hidrocarbonetos cuticulares de fêmeas não fecundadas de *Atta bisphaerica* (a), *Atta capiguara* (b), *Atta laevigata* (c) e *Atta sexdens rubropilosa* (d). Número de picos indicados nas tabelas 2 a 5 dependendo da espécie. Alguns picos com áreas relativas altas não foram numerados por se tratarem de contaminantes e não constam nas tabelas.

A análise dos componentes principais evidenciou a clara separação entre os grupos de alados assim como descrito nas tabelas. Mostrando, dessa forma, que as espécies possuem identidades de hidrocarbonetos cuticulares distintas permitindo assim a separação dentre elas (Figura 5).



**Figura 5.** Análises de componentes principais de castas temporárias de quatro espécies do gênero *Atta*.

O Fator 1 + Fator 2 da Análise dos Componentes Principais (PCA) descreveram 56.16% em machos e 52.26% para fêmeas não fecundadas da variação total observada, enquanto que a soma dos três primeiros fatores descreveram 65.56 % para machos e 64.58% em fêmeas não fecundadas dessa variância.

#### 1.1.4 Discussão

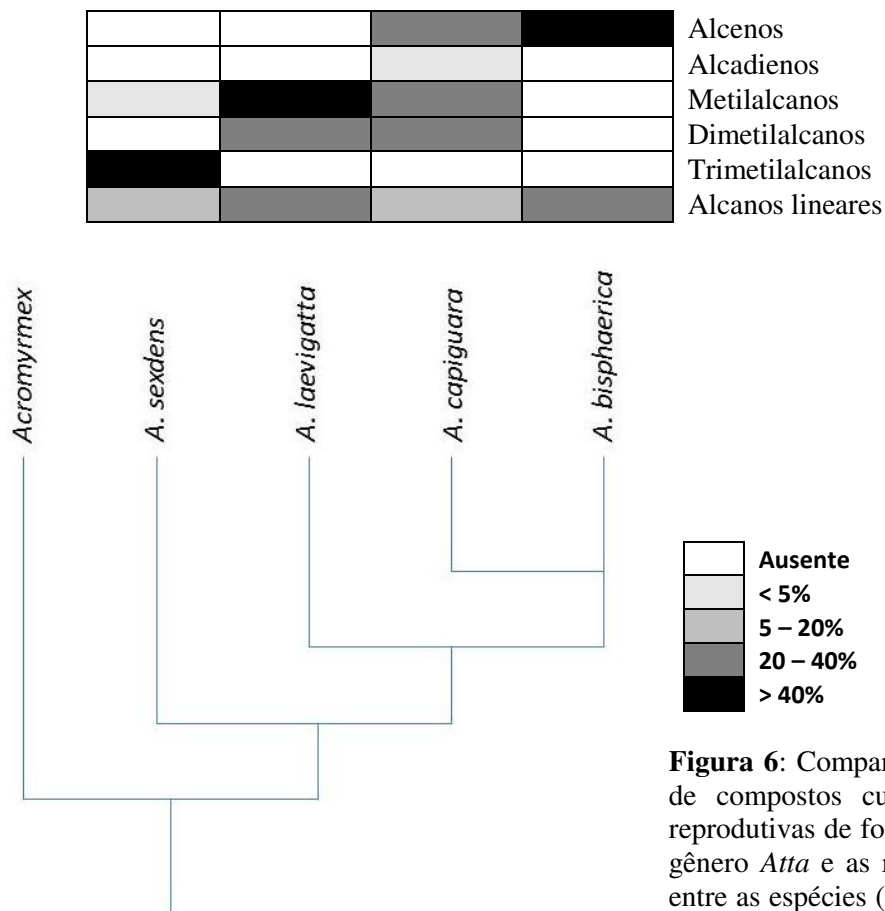
Os hidrocarbonetos cuticulares são distintos para as castas temporárias, sendo a diversidade de compostos maiores em fêmeas não fecundadas do que em machos e diferem entre as quatro espécies de *Atta* como caracterizado neste estudo. Os resultados demonstraram claramente que o perfil dos compostos cuticulares pode ser utilizado como uma ferramenta eficiente para a separação das espécies, sendo espécie-específico para as quatro espécies analisadas corroborando com os dados já descritos por Martin e Drijfhout, (2009) ao revisarem trabalhos com espécies de formigas e verificaram esta especificidade dos compostos cuticulares.

Martin e Drijfhout, (2009) verificaram que, geralmente, quando as formigas produzem hidrocarbonetos complexos, elas também exibem os de estruturas mais simples, porém existem exceções e uma delas é uma das poucas cortadeiras que tiveram o perfil químico descrito como *Atta columbica*, que apresentou apenas compostos complexos, (trimetilalcanos) (MARTIN e MACCONNEL, 1970); já para as espécies do presente estudo, todas apresentaram os mais simples (Tabelas 2 a 5). A outra espécie pertencente a tribo Attini caracterizada foi *Acromyrmex subterraneus* que possui monometilalcanos e dimetilalcanos (RICHARD et al. 2004).

Ao observar os distintos hidrocarbonetos cuticulares identificados, verificou-se que os mesmos são eficientes na separação das espécies e que eles também podem ser uma ferramenta para uso na sistemática filogenética deste grupo. Nos estudos de BACCI Jr. et al., (2009) utilizando informações de DNA e seqüência de fragmentos de três genes mitocondriais (COI , tRNA leucina e COII) e um gene nuclear (EF1 - AF1), as relações entre as espécies estudadas nesse trabalho são as mesmas para as análises de parcimônia e ‘likelihood’ baseadas nos resultados moleculares. Ao plotar os dados da composição química cuticular sobre a topologia proposta por Bacci e colaboradores (2009) pode se inferir sobre a evolução dos compostos cuticulares encontrados e verificar a possibilidade do uso destes na sistemática filogenética do gênero *Atta* (Figura 6).

Ao analisar as classes de compostos, observa-se que os alcanos lineares são comuns a todos os grupos. Trimetilalcanos é uma autapomorfia de *Atta sexdens rubropilosa*. Metilalcanos surgem em *A. sexdens rubropilosa* e são perdidos apenas em *A. bisphaerica*. Dimetilalcanos surgem em *A. laevigatta* e também são perdidos em *A. bisphaerica*. Alcenos são sinapomorfia do grupo *A. capiguara* e *A. bisphaerica*, enquanto que alcadienos são

autapomorfias de *A. capiguara*. Nessa transposição, podemos observar que a maior diversidade encontrada em *A. capiguara* é resultante da preservação dos estados ancestrais (i. e. compostos ramificados), compartilhamento das sinapomorfias do grupo (i. e. alcenos), bem como a presença de compostos exclusivos da espécie (i. e. alcadienos).



**Figura 6:** Comparação entre as classes de compostos cuticulares de fêmeas reprodutivas de formigas cortadeiras do gênero *Atta* e as relações filogenéticas entre as espécies (relações filogenéticas extraídas de Bacci jr et al., 2009).

Verificou-se, portanto que os hidrocarbonetos cuticulares são ferramentas eficientes para a separação de espécies e podem contribuir para a melhor construção da filogenia do gênero, principalmente os indivíduos reprodutores que são difíceis identificá-los.

### 1.1.5 Referências Bibliográficas

- AUTUORI, M. 1942. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera – Formicidae). II. O saúveiro inicial (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.13, n. 7, p.67-86. Apud MOREIRA, M.M. **Morfometria de rainhas do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae), Arquitetura interna e infecção pelo fungo parasita *Escovopsis* de ninhos iniciais**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. 2013. 102 p.
- BACCI Jr. et al. Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 51, p. 427–437, 2009.
- BENTO, J.M.S. **Condições climáticas para o voo nupcial e reconhecimento dos indivíduos em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)**. Dissertação de Mestrado em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa. 1993. 99 p.
- BORGMEIER, T. Revision der Gattung *Atta* Fabricius Hymenoptera, Formicidae). **Studia Entomologica** v. 22, p. 321–390, 1959.
- DAHBI et al. Chemistry of the postpharyngeal gland secretion and its implication for the phylogeny of the Iberian *Cataglyphis* species (Hymenoptera: Formicidae). **Chemoecology**, v. 7, p. 163–171. 1996.
- EMERY, C. 1913. Études sur les Myrmicinae: V–VII. Annales de la Société Entomologique de Belgique 57, 250–262. Apud BACCI Jr. et al.. Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 51 p. 427–437, 2009.
- FLETCHER, M.T. et al. Diverse cuticular hydrocarbons from Australian cane beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). *Australian Journal Entomology* v. 47, p. 153–159. 2008.
- GONÇALVES, C. R. Distribuição, biologia e ecologia das saúvas. **Divulgação Agrônômica**, Rio de Janeiro, n. 1, p. 2-10, 1960.
- HOWARD, R. W. and BLOMQUIST, G. J. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. **Annual Review Entomology** v. 50, p. 371–393. 2005.

- LOCKEY, K.H. Review – Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparative Biochemistry Physiology**, 89B, p. 595–645, 1988.
- MARTIN, M.M. e MACCONNEL, J.G. 1970 The alkenes of the ant *Atta colombica*. **Tetrahedron** v. 26, p. 307–319, 1970.
- MARTIN, S. J. et al. Evolution of species-specific cuticular hydrocarbon patterns in *Formica* ants. **Biological Journal Linnean Society** v. 95, p. 131–140, 2008.
- MARTIN, S.; DRIJHOUT, F. A Review of Ant Cuticular Hydrocarbons. **Journal Chemical Ecology** v. 35, 1151–1161, 2009.
- MOREIRA, A.A. et al. Comparação entre parâmetros externos e internos de ninhos de *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae). **Acta Scientiarum**, v.24, p.369-373. 2001.
- MOREIRA, A.A. et al. Nest architecture of *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). **Studies on Neotropical Fauna and Environment**. 39, 109-116, 2004.
- MOREIRA, M.M. **Morfometria de rainhas do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae), Arquitetura interna e infecção pelo fungo parasita *Escovopsis* de ninhos iniciais**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. 2013. 102p.
- MOSER et al. Eye size and behaviour of day- and night-flying leafcutting ant alates. **Journal of Zoology** 264, p. 69–75, 2004.
- NUNES, et al. Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? **Animal Behaviour** doi:10.1016/j.anbehav.2007.08.028, 2008.
- OZAKI et al. Ant Nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. **Science** v.309, 311-314, 2005.
- RICHARD, F.E. et al. Food influence on colonial recognition and chemical signature between nestmates in the fungus growing ant *Actomyrmex subterraneus subterraneus*. **Chemoecology** v.14, p.9-16, 2004.
- TRIPLEHORN, C.A. e JOHNSON, N.F. **Estudo dos insetos**. Cengage Learning 809 p., 2011.



**PARTE II – Influência dos SEMIOQUÍMICOS na atratividade das plantas para as formigas cortadeiras**

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na relação de mutualismo obrigatório, o fungo é a base alimentar das formas imaturas das colônias de formigas cortadeiras. As quantidades de energia e nutrientes oriundas dele são muito baixas (BASS e CHERRETT, 1995; SILVA et al., 2003), pois em operárias adultas ocorre também a ingestão direta de seiva das plantas no momento do corte e recorte do material (QUINLAN e CHERRETT, 1979; FORTI e ANDRADE, 1999), sendo apenas 5% do valor energético dos adultos obtido através do fungo (CHERRET, 1980). As forrageiras além da seiva consomem lipídios presentes em várias estruturas das plantas, como os corpos de alimentação e os elaiossomas das sementes (BUENO et al., 2008).

O forrageamento consiste na seleção, no corte e no transporte do material vegetal para dentro da colônia (DELLA LUCIA, 1993). Apesar, das formigas cortadeiras cortarem inúmeras quantidades de plantas de diferentes espécies, elas apresentam preferências por algumas. As operárias também preferem folhas jovens e flores, no entanto, podem cortar folhas maduras e secas, optando pelas caídas no chão (FORTI e BOARETTO, 1997). Vários fatores influenciam na decisão sobre a escolha de um vegetal, como a presença de composto tóxico às formigas e/ou ao seu fungo simbionte e até mesmo o teor de umidade vegetal pode ser determinante, além disso, esta escolha varia entre colônias da mesma espécie (PACHECO e FILHO, 1987).

Portanto, as preferências do material vegetal ocorrem em função da colônia e também do substrato disponível, pois a qualidade e a quantidade de plantas palatáveis determinam o local a ser explorado. Espécies vegetais que apresentam maior atratividade serão mais suscetíveis ao corte (RAMOS e FORTI, 2007), podendo mudar a escolha da planta a ser forrageada quando encontram uma fonte de alimento mais atrativa (MARICONI, 1970).

Em um sistema ecológico de Cerrado, o elevado consumo de folhagem pelas saúvas pode afetar negativamente as chances de sobrevivência das plantas, já que as formigas podem atuar sobre elas diretamente, como por exemplo, causando a morte de plantas jovens devido aos inúmeros ataques. Indiretamente, também podem influenciar, pois podem ocasionar devido ao corte das plantas um crescimento mais lento, além de ficarem mais susceptíveis aos efeitos adversos do fogo e da seca (VASCONCELOS, 1997; VASCONCELOS et al., 2003). Em contrapartida, existem compostos químicos presentes nas plantas, gerados em resposta a herbivoria, que são alguns metabólitos secundários, estes são reconhecidos pelas formigas

cortadeiras, que rejeitam estas plantas em campo balanceando essa interação (LITTLEDYKE e CHERRETT, 1978).

Os produtos gerados das plantas, tais como: alcaloides, quinolonas, óleos essenciais, glicosídeos e flavonóides caracterizam famílias inteiras ou grupos delas que fazem com que os animais em geral as evitem completamente (RAVEN et al., 2001). Essas substâncias atuam no encontro e reconhecimento do hospedeiro pelos insetos, desencadeando processos comportamentais: podendo ser atrativo (estímulo positivo), repelente (estímulo negativo), arrestante (estímulo que causa uma lentidão durante a atividade de alimentação, provavelmente devido a atratividade do substrato, pois o inseto permanece mais tempo sob o mesmo) ou deterrente (este estímulo impede a manutenção da alimentação devido aos efeitos negativos, como por exemplo, diminuição do tamanho da esponja fúngica nas colônias de formigas cortadeiras) (WITTHAKER e FEENEY, 1971).

Para formigas cortadeiras, devido ao hábito das mesmas em utilizar diversas fontes vegetais, o fungo não é sobrecarregado com substâncias que poderiam ser tóxicas a um ou ambos dos simbioses (HOWARD et al., 1988). Mas, também, estes compostos podem gerar uma redução na amplitude do nicho alimentar dependendo do seu grau de toxicidade, pois as formigas podem optar em não fazer uso destes vegetais. Existem outros fatores dessa natureza ainda presentes que influenciam na escolha, como: a produção de compostos associados a idade, redução no conteúdo de água, aumento da dureza e pobreza nutricional da folha (STRADLING, 1978; WALLER, 1986).

Além disso, as operárias são capazes de selecionar o material a ser cortado (OLIVEIRA et al., 2004) dependendo de outros fatores, tais como: valor nutricional exigido para o simbiote e barreiras físicas das plantas (ROCKWOOD, 1976; HUBBEL e WIEMER, 1983). Dentre os físicos, a densidade, tipo de tricoma, espessura da folha, presença de látex, exposição à luz estão associados com esta seletividade (LITTLEDYKE e CHERRETT, 1978).

Assim, nesta seleção devem-se enfatizar alguns aspectos, tais como, a natureza de decisão, limitações e unidades nutricionais, maximização da taxa de ganho energético, escolha de nutrientes complementares e o papel de substâncias tóxicas da vegetação disponível (FOWLER e ROBINSON, 1979; STRADLING e POWELL, 1986).

Como atrativos presentes nos substratos, existem estruturas como os elaiossomas, consumidos pelas operárias como já mencionado, em que sua constituição possui lipídios e

ácidos graxos. Tais estruturas são removidas pelas formigas, que conseqüentemente fazem a dispersão das sementes (HANDEL e BEATTIE, 1990).

Em estudos com formigas do gênero *Atta*, foram peletizadas iscas com elaiossomas de sementes de *Mabea fistulifera* (Malpighiales, Euphorbiaceae) que foram encontradas nos montes de terra solta dos ninhos (PETERNELLI et al., 2004), observou-se que elas foram atrativas e as operárias mínimas foram responsáveis pelo maior processamento deste material (PETERNELLI, 2007). Verificou-se assim, a composição química destas estruturas, que apresentou um constituinte de ácidos graxos, triglicerídeos e uma quantidade menor de monoacilglicerol e diacilglicerol (PETERNELLI et al., 2008). Em outro trabalho com *A. sexdens rubropilosa* foi verificado que o endocarpo de *Citrus sinensis* (Sapindales, Rutaceae) quando comparado com outras partes do fruto foi o mais atrativo, local onde o conteúdo lipídico também é maior (CARLOS et al., 2010). Em *Acromyrmex octospinosus* compostos lipídicos e não lipídicos presentes na polpa cítrica tiveram uma ação arrestante (MUDD et al., 1978).

Em estudos com *Atta cephalotes*, os extratos lipídicos encontrados em folhas velhas foram inibidores para o corte (LITTLEDYKE e CHERRETT, 1978), para *Hymenaea courbaril* (Fabales, Fabaceae) os terpenóides presentes nesta planta tiveram ação repelente (HUBBEL et al., 1983), assim como os encontrados em *Melampodium divaricatum* (Asterales, Asteraceae) (HUBERT e WIEMER, 1985), enquanto que os taninos de *Inga oerstediana* (Fabales, Fabaceae) foram deterrentes (NICHOLS-ORIAN, 1992). Já os flavonóides encontrados em *Lonchocarpus minimiflorus* (Fabales, Fabaceae) apresentaram ação repelente (ROUSSIS et al., 1987). As lactonas e sesquiterpenos de *Eupatorium* sp. (Asterales, Asteraceae) e compostos voláteis de *Astronium graveolens* (Sapindales, Anacardiaceae) também tiveram o mesmo efeito (OKUNADE e WIEMER, 1985; CHEN et al., 1984). Já compostos químicos não identificados em *Atta sexdens rubropilosa* apresentaram efeitos deletérios ao simbiote quando fornecido *Sesamum indicum* (Lamiales, Pedaliaceae) (HEBLING-BERALDO et al., 1991).

Também diferentes tipos de ceras presentes nas folhas podem provocar respostas distintas, levando em consideração sua composição química. As plantas cujas folhas não são carregadas pelas formigas, não necessariamente apresentam ceras repelentes, bem como, espécies de vegetais cujas folhas são cortadas, também não significa que as ceras irão possuir um efeito positivo. Por exemplo, estudos demonstram que algumas espécies de *Atta* preferem

monocotiledôneas por apresentarem moderados índices de óleos e ceras epicuticulares em sua composição (GARCIA et al., 2005). As formigas cortadeiras ocasionam grandes prejuízos em culturas de gramíneas, principalmente em *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar), que podem chegar a 3,2 toneladas de cana/ha (PRECETTI et al., 1988).

*Saccharum officinarum* é considerada muito atrativa para as cortadeiras, porém não é favorável ao crescimento do fungo (BOARETTO, 2000). A atratividade desta planta pode estar relacionada com a presença de compostos observados nas ceras epicuticulares de *Saccharum* spp., tais como: hidrocarbonetos, álcoois, esteróides, ácidos graxos e aldeídos; sendo que os hidrocarbonetos correspondem a 50% dessa composição (PETACCI, 1997).

Nota-se, portanto, que as formigas do gênero *Atta* não demonstram um padrão randômico de forrageamento e que este não é baseado na distribuição espacial e abundância, mas sim, em atratividade e repelência em uma grande gama de características dentre as quais, a composição química e o conteúdo foliar influenciam (HOWARD, 1987; HOWARD et al., 1988; SALATINO et al., 1998).

Assim, para formigas cortadeiras, são necessários estudos para conferir realmente o papel de compostos químicos na seletividade das plantas atacadas. Muitos autores sugerem que a qualidade e características físicas das folhas é o que define (ROCKWOOD, 1976; STRADLING, 1978); outros, que os compostos químicos presentes nos vegetais seriam substâncias inibidoras ou repelentes (LITTLEDYKE e CHERRETT, 1978); já Verza et al. (2007), defendem que a escolha do material está primeiramente associada às características químicas do substrato, e só num segundo momento, após a escolha é que os fatores físicos exercerão seu papel.

Para outros pesquisadores, a exploração ou não de determinada planta pelas operárias, está associada ao conteúdo de água e teor de nutrientes das folhas, existindo correlação positiva entre as variações quantitativas de nutrientes e água, sendo que os compostos secundários produzidos pelas plantas seriam uma variável adicional que atuaria nessa escolha (HOWARD, 1987). O trabalho de ROCKWOOD (1976) enfatizam a importância dos compostos químicos, porém complementa que se deve também considerar a interferência da sazonalidade nessa composição.

É fato que os compostos químicos presentes nas plantas atuam na seleção. Porém, estudos para melhor definir esse papel e seu grau de importância são necessários. Por isto, o

presente trabalho analisou a influência dos hidrocarbonetos que compõe as ceras epicuticulares e os compostos químicos presentes em tricomas na atratividade das folhas para operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASS, M.; CHERRETT, J.M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology** v. 20, p.1–6, 1995.
- BOARETTO, M.A.C. **Seleção de substratos com potencial para uso em iscas granuladas para as saúvas *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 e *Atta bisphaerica* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) e isolamento do fungo simbiote.** Botucatu, Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, 74 p. 2000.
- BOARETTO, M.A.C; FORTI, L. C. **Formigas cortadeiras, biologia, ecologia, danos e controle.** 59 p., 1997.
- BUENO, O.C. et al. Utilização de alimentos pelas formigas cortadeiras. In: **Insetos Sociais da biologia à aplicação.** Eds. Vilela EF, Santos I.A., Schoereder J.H., Serrão J.E., Campos L.A.O., Lino-Neto, J., UFV, Viçosa, p. 96-114, 2008.
- CARLOS, A. A. et al. Behavioral Response of the leafcutter ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae), to components of citrus pulp. **Sociobiology** v.55, n.2, p.1-10, 2010.
- CHEN, T.K.; WIEMER, D.F.; HOWARD, J.J. A volatile leafcutter ant repellent from *Astronium graveolens*. **Nature** v. 71, p. 97-98, 1984.
- CHERRETT; J.M. Possible reasons for the mutualism between leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) and their fungus. **Biology Ecology Mediterranean** v.7, p.113-122, 1980.
- DELLA LUCIA, T. M. C., In: **As formigas Cortadeiras.** Editora Folha de Viçosa, p. 262, 1993.
- FOWLER H. G., ROBINSON, S. W. Foraging by *Atta sexdens* (Formicidae: Attini): seasonal patterns, caste and efficiency. **Ecology Entomology** v.4, p.239-247, 1979.
- GARCIA, M.G; et al. Interference of Epicuticular Wax from Leaves of Grasses in Selection and Preparation of Substrate for Cultivation of Symbiont Fungus by *Atta capiguara* (Hym. Formicidae). **Sociobiology** v.45, n. 3, 12 p., 2005.

- HANDEL, S.N.; BEATTIE A.J. Seed dispersal by ants. **Scientific American** v.263, n.2, p.76-83, 1990.
- HEBLING-BERALDO, M.J.A et al. Influência do tratamento com folhas de *Sesamum indicum* sobre o metabolismo respiratório de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** v.20, n. 1, p. 27-33, 1991.
- HOWARD, J.J.; CAZIN Jr., J.; WIEMER, D.F Toxity of terpenoid deterrents to the leaf-cutting *Atta cephalotes* and its mutualistic fungus. **Journal Chemical Ecology**, v.14, p.59-69, 1988.
- HOWARD, J.J. Leafcutting ant diet selection: the role of nutrients, water, and secondary chemistry. **Ecology** (Engl. Transl. Ekol.) v. 68, n. 3, p. 503-515, 1987.
- HUBBEL, S.P.; WIENER, D.F. Host plant selection by an Attine ant. In: Jaisson P. (Ed). **Social insects in the tropics**. Paris: University of Paris Press v.2, p.157-163, 1983.
- HUBERT T.D., WIEMER D.F. Ant-repellent terpenoids from *Melampodium divaricatum*. **Phytochemistry** v. 24, p. 1197-1198, 1985.
- LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J.M. Olfactory responses of the leaf-cutting ants *A. cephalotes* L) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich.) (Hymenoptera: Formicidae) in the laboratory. **Bulletin of Entomology Research** v.68, p. 273-282. 1978.
- MARICONI, F.A.M. **As Saúvas**. Ed. Agronômica Ceres. 167 p., 1970
- MUDD, A.; PEREGRINE, D.J.; CHERRETT, J.M. The chemical basis for the use of citrus pulp as a fungus garden substrate by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich.) (Hymenoptera: Formicidae). **Bulletin of Entomology Research** v. 68, p. 673-685, 1978.
- NICHOLS-ORIAN, C.M. The susceptibility of young and mature leaves to leaf-cutter ants varies with light environment. **Biotropica** v. 24, p. 211-214, 1992.
- OKUNADE, A.L.; WIEMER, D.F. 1985b. Ant-repellent sesquiterpene lactones from *Eupatorium quadrangularae*. **Phytochemistry** (Oxford) v. 24, 1199-1201.



- PACHECO, P.; BERTI-FILHO, E. Formigas quenquéns. In: **Formigas Cortadeiras e o seu controle**. (Pacheco P. and Berti-Filho E., Eds), IPEF/GTFC, Piracicaba, Brazil. p. 3 – 17, 1987.
- PETACCI, F. **Hidrocarbonetos cuticulares e epicuticulares de plantas relacionadas à formigas cortadeiras; Constituintes químicos de *Spathodea campanulata***. Tese de Doutorado em Química. Universidade Federal de São Carlos. 82 p, 1997.
- PETERNELLI, E.F.O.; DELLA LUCIA, T.M.C.; MARTINS S.V. Espécies de formigas que interagem com as sementes de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae). **Revista Árvore** v.28, n.5, p.733-738, 2004.
- PETERNELLI E.F.O. **Interação entre formigas e sementes, com ênfase nas cortadeiras**. Tese de Doutorado em Agronomia (Entomologia). Universidade Federal de Viçosa. 77 p., 2007.
- PETERNELLI, E.F.O et al. Isolation of compounds attractive to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) from *Mabea fuistulifera* elaiosome. **Química Nova** v. 31, n. 3, 475-478, 2008.
- PRECETTI, A.A.C.M. et al. Perdas de produção em cana-de-açúcar causadas pela saúva-mata-pasto, *Atta bisphaerica*. Parte I. **Boletim Técnico Coopersucar**, v.42, p.19-26, 1988.
- QUINLAN, R.J.; CHERRETT, J.M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomology**, Carmarthen, v. 4: 151-160, 1979.
- RAMOS, V.M.; FORTI, L. C. Soluções para o Controle de *Atta capiguara* Gonçalves 1954 (Hymenoptera: Formicidae) com Iscas Tóxicas. **Biológico**, São Paulo, v. 69, suplemento 2, p.77-80, 2007.
- RAVEN, P.R.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 6<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- ROCKWOOD, L.L.. Plant selection and foraging patterns in two species of leaf-cutting ants (*Atta*). **Ecology**, Washington, v. 57 n.1, p. 48-61, 1976.
- ROUSSIS, V.; AMPOFO, S.A.; WIEMER, D.F. Flavanones from *Lonchocarpus miniflorus*. **Phytochemistry** v.26, p. 2371-2375, 1987.
- SALATINO, A.; SUGAYAMA, R.L.; NEGRI, G.; VILEGAS, W. Effect of constituents of the foliar wax of *Didymopanax vinosum* on the foraging activity of the leaf-cutting ant

*Atta sexdens rubropilosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.86, p. 261-266, 1998.

SILVA, A. et al. Survival on *Atta sexdens* on Different Carbon Sources. **Journal Insect Physiology** v. 49, p.307-313, 2003.

STRADLING, D.J. Food and feeding habits of ants. In: Brian, M.V. (ed.) **Production ecology of ants and termites**. Cambridge: Cambridge University Press, p.81-106, 1978.

STRADLING, D.J.; POWELL, R.J. The colonizing of more highly productive fungus strains: a factor in the speciation of fungus-growing ants. **Experientia** v. 42: 962-964, 1986.

VASCONCELOS, H.L.; MACEDO, A.C.C.; VILHENA, J.M.S. Influence of topography on the distribution of ground-dwelling ants in an Amazonian forest. **Studies on Neotropical Fauna and Environment** v.38, p. 115-124, 2003.

VASCONCELOS, H.L. Foraging activity of an Amazonian leaf-cutting ant: responses to changes in the availability of woody plants and to previous plant damage. **Oecologia**, Heidelberg v.112, p. 370-378, 1997.

VERZA S.S et al. Influence of physical and chemical factors during foraging and culture of the symbiont fungus in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Insect Science** 14, p. 295-300, 2007.

WALLER D.A. The foraging ecology of *Atta texana* in Texas. In: Lofgren, C. e Vander Meer, R.K. **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder and London: Westview Press, p. 146-158, 1986.

WEBER N.A. **Gardening ants: the attines**. Philadelphia: Memoirs of the American Philosophical Society, 146 p., 1972.

WITTHAKER, R.H.; FEENEY, P.P. Alleochemistries: Chemical interactions between species. **Science** v. 171, p. 757-770, 1971.

## 2.1. O papel dos hidrocarbonetos presentes em ceras epicuticulares na atratividade para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae).

### Resumo

As formigas cortadeiras *Atta* (Formicidae: Attini) utilizam material vegetal como alimento e como substrato para o cultivo de seu fungo simbiote. Estas formigas selecionam o material a ser forrageado, e para entender este mecanismo, diversas hipóteses já foram levantadas. Porém, não está claro o papel dos componentes químicos das plantas neste processo. Portanto, o presente estudo teve como objetivo estudar a importância dos hidrocarbonetos presentes nas ceras epicuticulares para a atratividade de diversas plantas de Cerrado (*Tocoyena formosa* nova, *Tocoyena formosa* senescente, *Viola sebifera* nova, *Viola sebifera* senescente, *Schefflera vinosa* nova, *Schefflera vinosa* senescente) e uma exótica (*Acalypha wilkesiana*), para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Para isso, os hidrocarbonetos epicuticulares presentes nas folhas das plantas estudadas foram descritos. Além disso, foram realizados três experimentos distintos, ofertando na arena de forrageamento para um grupo de quatro colônias (repetições), de forma aleatória, ao mesmo tempo, oito tratamentos: (i) - fragmentos foliares das plantas mencionadas e discos de papel filtro sem atrativo (controle); (ii) - extratos das ceras epicuticulares das sete plantas e discos de papel filtro sem atrativo (controle); (iii) - frações de hidrocarbonetos epicuticulares obtidas das plantas estudadas e discos de papel filtro sem atrativo (controle). Avaliou-se o carregamento, verificando os dois primeiros tratamentos carregados em sua totalidade pelas operárias. Após esta análise, observaram-se os comportamentos de processamento e incorporação dos substratos no fungo simbiote. A espécie *A. wilkesiana* apresentou em seu perfil de hidrocarbonetos presentes nas ceras epicuticulares, o tricoseno (C24:1) como o majoritário. Esta planta foi a mais carregada pelas operárias de *A. sexdens rubropilosa*, assim como as ceras epicuticulares da mesma; já as frações de hidrocarbonetos não diferiram no carregamento quando comparadas com as outras plantas. A segunda planta que teve as folhas mais carregadas foram as de *V. sebifera*, porém as frações de hidrocarbonetos dela também não diferiram na atratividade quando comparada com os outros tratamentos. Após 24 horas de experimento, a maioria das folhas haviam sido carregadas, inclusive o tratamento testemunha (discos de papel filtro), exceto *T. formosa* senescente e *S. vinosa* (novas e senescentes) que apresentaram baixo carregamento. Contudo, as ceras dos distintos tratamentos após 24 horas, praticamente foram carregadas em sua

totalidade e os hidrocarbonetos foram 100% carregados. No processamento e incorporação destes substratos, verificou-se um maior número de formigas desempenhando atos comportamentais nas folhas e ceras de *A. wilkesiana*. Porém, nas observações de frações de hidrocarbonetos desta planta e dos outros tratamentos não ocorreu diferença no número de formigas processando os tratamentos no fungo simbionte. Outro ponto a ser destacado é que os comportamentos de repicar e lambar foram os mais frequentes durante as observações. Assim, com base nos resultados, conclui-se que os hidrocarbonetos são atrativos para operárias de *A. sexdens rubropilosa*, podendo ser um dos fatores que favorecem a formiga a forragear tal planta. As formigas foram seletivas a determinado substrato, mas com a disponibilidade de outras fontes de alimento e com a ausência de compostos repelentes, possibilitaram que as operárias usufríssem das várias plantas ofertadas.

**Palavras chave** – formigas cortadeiras, forrageamento.

### 2.1.1. Introdução

O conjunto de atos comportamentais que possibilitam aos organismos encontrarem e utilizarem as fontes de energia e nutrientes para a sua sobrevivência é definido como forrageamento (KREBS e DAVIS, 1987). No ato da seleção do material a ser forrageado, as formigas discernem odores, distinguindo substâncias químicas (LITTLEDYKE e CHERRETT, 1978) e utilizam esse odor aprendido como critério durante a seleção (ROCES, 1990).

Esta seleção também pode variar no decorrer do ano; para plantas de cerrado, por exemplo, algumas são coletadas todos os meses como *Hancornia speciosa* (Gentinales, Apocynaceae) e *Kielmeyera coriacea* (Malpighales, Clusiaceae), contudo, outras são forrageadas apenas em determinados períodos como *Caryocar brasiliensis* (Malpighales, Caryocaraceae). Fato este provavelmente relacionado com a variação sazonal das ceras epicuticulares presentes nas folhas (SUGAYAMA e SALATINO, 1993).

O material vegetal depois de selecionado chega à colônia e inicia-se o processo de preparação e incorporação no jardim de fungo. As operárias lambem o substrato para remover impurezas e a camada de cera epicuticular, dispendo de vários indivíduos e mais tempo neste ato comportamental. Segundo alguns autores, a remoção desta camada é importante, pois é conhecido que ela é um fator limitante ao crescimento do fungo, mas tais atos levam as formigas a ingerirem pequenos fragmentos de folhas e ceras que possivelmente servirão de fonte alimentar (DINIZ, 2000; ANDRADE et al., 2002).

Com base nisso, o presente estudo verificou o papel das frações de hidrocarbonetos presentes nas ceras epicuticulares na atratividade de diversas plantas para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Testou-se a hipótese de que a presença de determinados hidrocarbonetos presentes nas ceras epicuticulares das folhas são os responsáveis pelo forrageamento destas plantas pelas formigas cortadeiras.

### 2.1.2. Material e Métodos

A coleta das plantas estudadas foi conduzida no município de São Carlos-SP, em um fragmento de Cerrado secundário presente no *Campus* da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e *Acalypha wilkesiana* em ambiente urbano por se tratar de uma planta exótica cultivável. As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química, UFSCar e os bioensaios comportamentais no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro.

#### ✓ *Análises químicas*

Folhas jovens e senescentes (5 a 10 folhas, dependendo do tamanho foliar, sendo de 2 a 4 indivíduos por espécie) de *Tocoyena formosa* (Gentianales, Rubiaceae), *Schefflera vinosa* (Apiaceae, Araliaceae), *Virola sebifera* (Laurales, Magnoniales) e folhas jovens de *Acalypha wilkesiana* (Malpighiales, Euphorbiaceae). As folhas jovens (novas) foram consideradas as mais próximas do ápice dos ramos e as senescentes (velhas) as mais amareladas por possuírem menos clorofila.

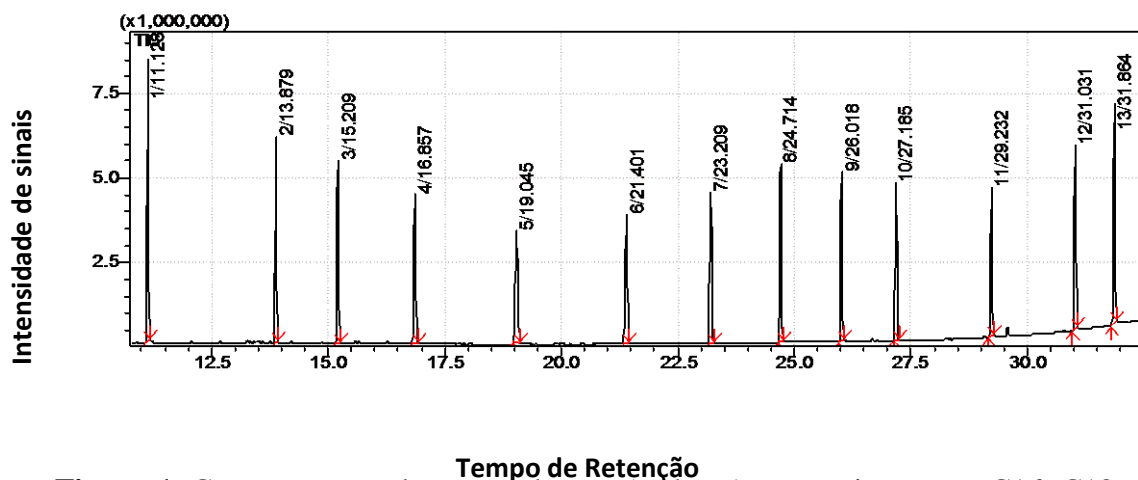
Estas folhas foram imersas em 400 mL de diclorometano, por um período de 30 segundos. O solvente foi retirado utilizando um evaporador rotativo, sob vácuo e o fracionamento dos extratos foi realizado por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (SUGAYAMA E SALATINO, 1993; PETACCI, 1997; SALATINO et al., 1998).

Posteriormente os compostos foram extraídos da sílica utilizando diclorometano e as frações analisadas por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), Modelo Shimadzu QP 5000, possibilitou a identificação de treze alcanos: C16, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26, C28, C30, C31, além do composto majoritário para cada indivíduo amostrado. As condições de rampa utilizadas foram: 100 °C/2min, 8°C/1min, 200 °C durante 5 minutos, 8 °C/min, 300°C, durante 15 minutos. Apenas em *Acalypha wilkesiana*, as análises cromatográficas não seguiram as mesmas condições de rampa, porque as descrições dos compostos foram realizadas anteriormente em outro experimento, sendo as seguintes condições: 80°C/1min, 12°C/1min, 310 °C, durante 20 minutos.

Uma solução contendo padrões dos treze alcanos, Aldrich, 29850-6, lote nº 03028 HQ foi injetada para possibilitar a identificação destes constituintes nas amostras. A análise

quantitativa foi realizada por meio de uma curva de calibração, cobrindo a faixa de 0.5 a 500 ppm (Figura 1). Quando os padrões disponíveis não caracterizaram os sinais cromatográficos altos e majoritários das plantas, os compostos foram identificados por meio de espectros comparados com os íons diagnósticos já descritos na literatura. A análise dos hidrocarbonetos epicuticulares de *Acalypha wilkesiana*, também foi feita pelos espectros, pois as condições de rampa desta planta não foram as mesmas estabelecidas para os padrões.

Com este bioensaio identificou-se os hidrocarbonetos presentes nas ceras em cada uma dessas plantas lenhosas mencionadas, utilizando 3 a 5 indivíduos diferentes para essa caracterização. O material testemunho das plantas utilizadas foi depositado no Herbário Rioclarense (HRCB) da Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, sob os seguintes registros: *Schefflera vinosa* - HRCB 57765; *Tocoyena formosa* - HRCB 57763; *Virola sebifera* HRCB 57764 e *Acalypha wilkesiana* – HRCB 59928.



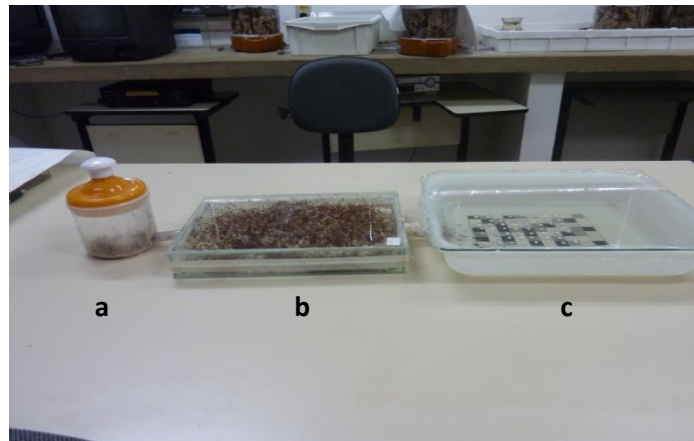
**Figura 1.** Cromatograma dos treze alcanos (padrões), respectivamente: C16, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26, C28, C30, C31. Na vertical do pico, o primeiro número refere-se ao número do pico (1 ao 13) e o segundo ao Tempo de Retenção.

#### ✓ *Análises de Atratividade*

Posteriormente, três experimentos foram realizados, em intervalos de 15 dias entre eles, ofertando-se separadamente fragmentos foliares, extratos das ceras epicuticulares e as frações dos hidrocarbonetos das plantas estudadas para um grupo de quatro colônias (repetições) de *A. sexdens rubropilosa*. Com isso verificou-se a atratividade destes substratos para as operárias destas formigas.

No primeiro bioensaio, pré-seleção de substratos, oito tratamentos de folhas (fragmentos foliares de 1.5 x 1.5 cm cada um) foram ofertados: *Tocoyena formosa* nova (1);

*Tocoyena formosa* senescente (2); *Virola sebifera* nova (3); *Virola sebifera* senescente (4); *Schefflera vinosa* nova (5); *Schefflera vinosa* senescente (6); *Acalypha wilkesiana* nova (7) e Discos de papel filtro (8: controle). Os tratamentos foram dispostos aleatoriamente na arena de forrageamento (Figura 2), sendo ofertados oito fragmentos foliares por tratamento, totalizando assim para cada colônia um total de 64 fragmentos.



**Figura 2.** Colônia de *A. sexdens rubropilosa*. **Legenda.** a: Arena de lixo; b: Arena do fungo; c: Arena de forrageamento.

Apenas *Acalypha wilkesiana* nova (7) foi utilizada nestas análises, por já haver descrições na literatura da atratividade desta planta (NAGAMOTO et al. 2009) podendo certamente inferir o papel das ceras epicuticulares e dos hidrocarbonetos presentes na seleção desta planta, conjuntamente com plantas de Cerrado com maiores concentrações de ceras epicuticulares devido ao ambiente em que ocorrem. Foram realizadas uma primeira e segunda análise da seletividade das plantas, por já se esperar que *Acalypha wilkesiana* fosse a mais carregada pelas operárias a priori.

O indivíduo de *A. wilkesiana* nova que teve seu perfil de hidrocarbonetos epicuticulares descritos foi utilizado nos bioensaios de atratividade com operárias de *Atta sexdens rubropilosa* e das outras plantas se utilizou aleatoriamente os indivíduos cujas análises químicas também foram realizadas.

Avaliou-se o carregamento dos tratamentos em 10, 20 e 30 minutos e a primeira e a segunda seleção, ou seja, quando um dos tratamentos era totalmente carregado, anotava-se o tempo e prosseguia com o experimento até um segundo tratamento ser totalmente levado



pelas operárias. Posteriormente, cessava-se o experimento e contabilizava o número dos outros fragmentos que também foram carregados. Este experimento foi realizado com quatro colônias mantidas em laboratório de *Atta sexdens rubropilosa*, com cada uma de volume de fungo aproximado de um litro, ressaltando que as colônias ficaram 24 horas sem alimentação antes dos experimentos e nenhuma delas haviam tido contato anteriormente com as plantas estudadas.

Após a avaliação do carregamento, uma pausa de 20 minutos foi dada para que ocorresse um maior carregamento dos tratamentos ofertados, e as observações comportamentais foram iniciadas, com o auxílio de um estereomicroscópio óptico. Os comportamentos descritos de acordo com a classificação de Andrade et al. (2002), foram registrados na arena do fungo: segurar, repicar, lambar, mastigar e incorporar; nos seguintes tempos: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 minutos. As câmaras de fungo destas colônias estavam dispostas em caixas de acrílico (30x 20 cm) transparentes para facilitar as observações.

Em um segundo bioensaio, realizou-se as análises de pré e pós-seleção de oito tratamentos, porém no lugar das folhas, extratos das ceras epicuticulares das plantas em estudo, foram impregnados em fragmentos de papel filtro, sendo também 8 fragmentos por tratamento, ou seja, 64 por repetição (colônia). Já no terceiro experimento, repetiu-se o mesmo procedimento, contudo, ofertaram-se as frações de hidrocarbonetos obtidas das ceras epicuticulares das plantas estudadas. Em ambos os experimentos também se utilizaram quatro repetições de *A. sexdens rubropilosa*.

Após 24 horas, observações na arena de fungo foram realizadas nos três bioensaios, com a finalidade de observar se os tratamentos foram carregados e também observou se as operárias levaram algum tratamento para a arena de lixo, sendo considerado comportamento de recusa do material.

#### ✓ *Análises estatísticas*

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk; em seguida, foram realizadas as Análises de Variância, correlação de Spearman, Kruskal-Wallis, Teste Mann-Whitney e os testes *a posteriori* de Tukey e Student Newman-Keuls (Statistica 10 e SAS Institute 2003).

### 2.1.3 Resultados

Para a média dos hidrocarbonetos quantificados amostrados nos indivíduos, em folhas de *Sechefflera vinosa novas*, o composto majoritário variou (Tabela 2, Figura 3A), já nas folhas senescentes, o predomínio foi de Hexacosano (C26). Na Figura 2B, as amostras das plantas 1 e 4 foram semelhantes na concentração relativa do hidrocarboneto majoritário (C26), que se sobreporam no gráfico.

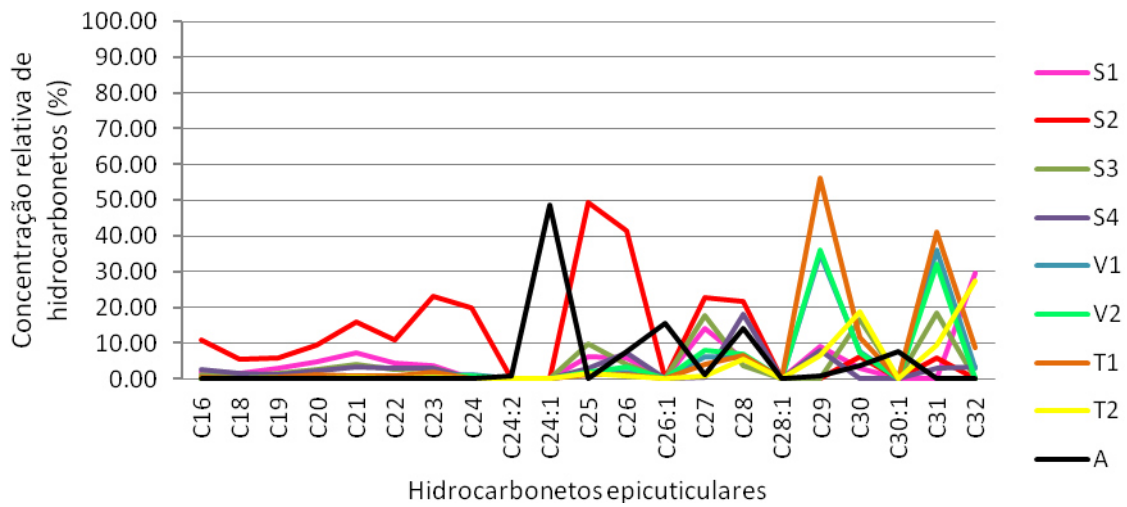
Em *Virola sebifera*, a maior média do composto químico identificado para esta espécie em folhas jovens foi o Hentriacontano (C31), para as duas amostradas analisadas; e em senescentes, para uma foi o Hentriacontano e para a outra o Nonacosano (C29), contudo para esta amostra o Hentriacontano foi a segunda maior concentração obtida (99.08 ppm) (Tabela 2 e Figura 3A e B). Em *Tocoyena formosa*, a média para a espécie, dos indivíduos amostrados foram também de alcanos lineares de cadeia longa, variando do Nonacosano (C29) a Dotriacontano (C32) (Tabela 2 e Figura 3A e B).

Em *Acalypha wilkesiana* apenas uma planta foi amostrada, sendo o majoritário, o alceno, Tetracoseno (C24:1), compondo 48.68% das folhas analisadas (Tabela 2). Esta espécie também se caracterizou por apresentar hidrocarbonetos insaturados (Figura 3A)

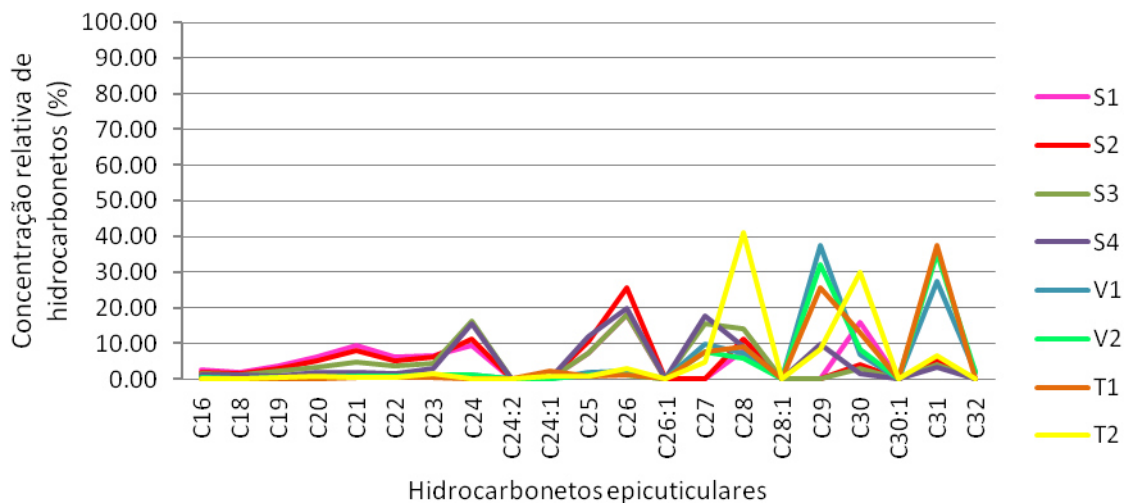
Quando comparadas as folhas jovens e senescentes, para cada espécie, quanto a concentração dos hidrocarbonetos quantificados, não se verificou uma variação significativa entre elas (Teste Mann-Whitney: *Tocoyena formosa* nova e *T. formosa* senescente:  $p=0.608$ ; *Virola sebifera* nova e *V. sebifera* senescente:  $p=0.980$ ; *Schefflera vinosa* nova e *S. vinosa*  $p=0.758$ ).

**Tabela 1.** Hidrocarbonetos majoritários para distintas espécies de plantas.

<b>Espécie de planta – indivíduo/ estágio foliar</b>	<b>Hidrocarboneto</b>	<b>Concentração (ppm)</b>	<b>Tempo de Retenção (min.)</b>
<i>Schefflera vinosa</i> – 1 folhas jovens	Dotriacontano (C32)	8.84	32.85
<i>Schefflera vinosa</i> – 2 folhas jovens	Pentacosano (C25)	13.63	27.13
<i>Schefflera vinosa</i> – 3 folhas jovens	Hentriacontano (C31)	19.72	31.87
<i>Schefflera vinosa</i> – 4 folhas jovens	Octacosano (C28)	5.33	28.24
<i>Schefflera vinosa</i> – 1 folhas senescentes	Hexacosano (C26)	4.27	28.23
<i>Schefflera vinosa</i> – 2 folhas senescentes	Hexacosano (C26)	7.11	28.23
<i>Schefflera vinosa</i> – 3 folhas senescentes	Hexacosano (C26)	19.35	27.14
<i>Schefflera vinosa</i> – 4 folhas senescentes	Hexacosano (C26)	5.81	27.12
<i>Tocoyena formosa</i> – 1 folhas jovens	Heptacosano (C29)	190.86	30.35
<i>Tocoyena formosa</i> – 2 folhas jovens	Dotriacontano (C32)	127.77	32.12
<i>Tocoyena formosa</i> – 1 folhas senescentes	Hentriacontano (C31)	127.77	32.05
<i>Tocoyena formosa</i> – 3 folhas senescentes	Triacotano (C30)	139.09	30.04
<i>Virola sebifera</i> – 1 folhas jovens	Hentriacontano (C31)	130.05	31.96
<i>Virola sebifera</i> – 2 folhas jovens	Hentriacontano (C31)	67.39	31.96
<i>Virola sebifera</i> – 1 folhas senescentes	Nonacosano (C29)	134.84	31.93
<i>Virola sebifera</i> – 2 folhas senescentes	Hentriacontano (C31)	74.53	30.26
<i>Acalypha wilkesiana</i> – 1 folhas jovens	Tetracosano (C24:1)	19.49	17.61



## A. Folhas jovens



## B. Folhas senescentes

**Figura 3.** Hidrocarbonetos epicuticulares descritos nas plantas estudadas. **Legenda:** S1. Planta 1 de *Sechefflera vinosa*; S2. Planta 2 de *Sechefflera vinosa*; S3. Planta 3 de *Sechefflera vinosa*; S4. Planta 4 de *Sechefflera vinosa*; V1. Planta 1 de *Virola sebifera*; V2. Planta 2 de *Virola sebifera*. T1. Planta 1 de *Tocoyena formosa*; T2. Planta 2 de *Tocoyena formosa*; A. Planta 1 de *Acalypha wilkesiana*.

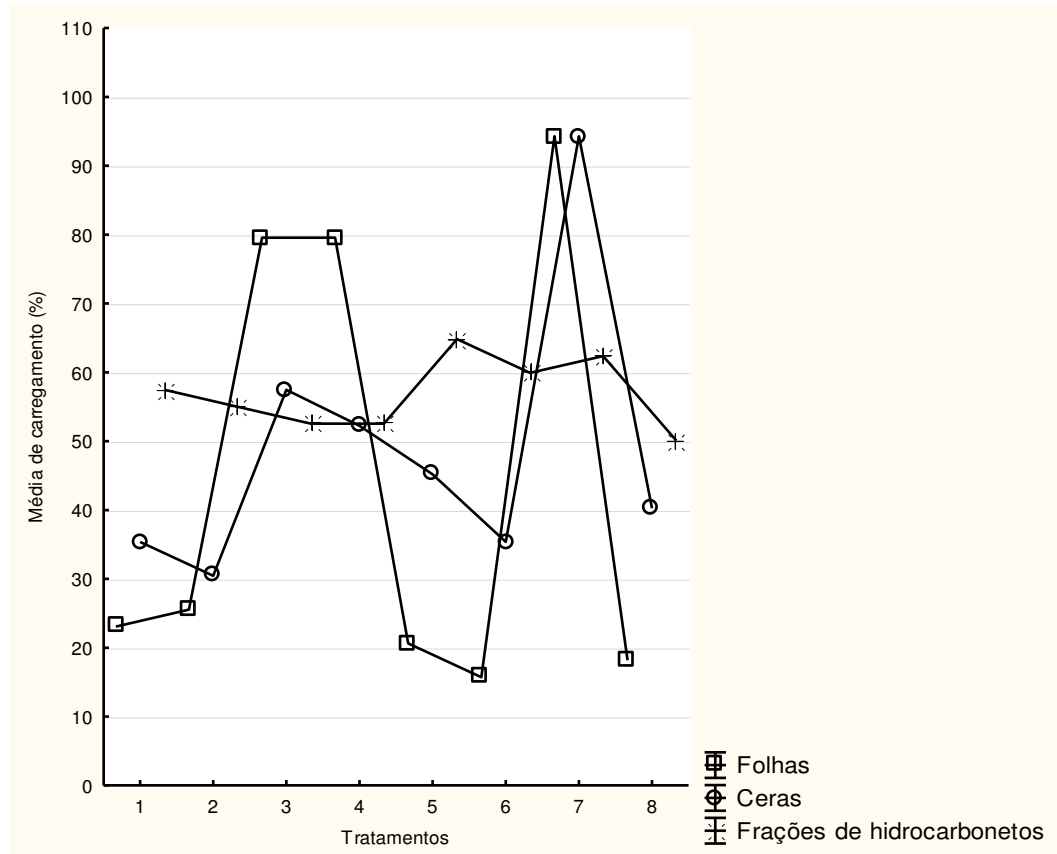
Para a atratividade de distintas plantas, como já esperado, observou-se a clara preferência por fragmentos foliares de *Acalypha wilkesiana*, este foi o primeiro tratamento a ser explorado pelas operárias, independente da posição do mesmo na arena de forrageamento, com 100% de carregamento (Tabela 2; Figura 4), tanto para suas folhas quanto ceras epicuticulares. Na segunda preferência de corte e transporte, fragmentos de folhas de *Virola sebifera* jovens e senescentes foram as mais carregadas pelas operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (Tabela 3; Figura 5). No entanto, para as frações de hidrocarbonetos presentes nas ceras das plantas estudadas não houve diferença no carregamento:  $F=1.619$ ;  $p=0.138$ .

**Tabela 2.** Ordem de carregamento de folhas e extratos impregnados com ceras epicuticulares na Primeira escolha por operárias de *A. sexdens rubropilosa* com base no Teste de Tukey ( $p=0.05$ ).

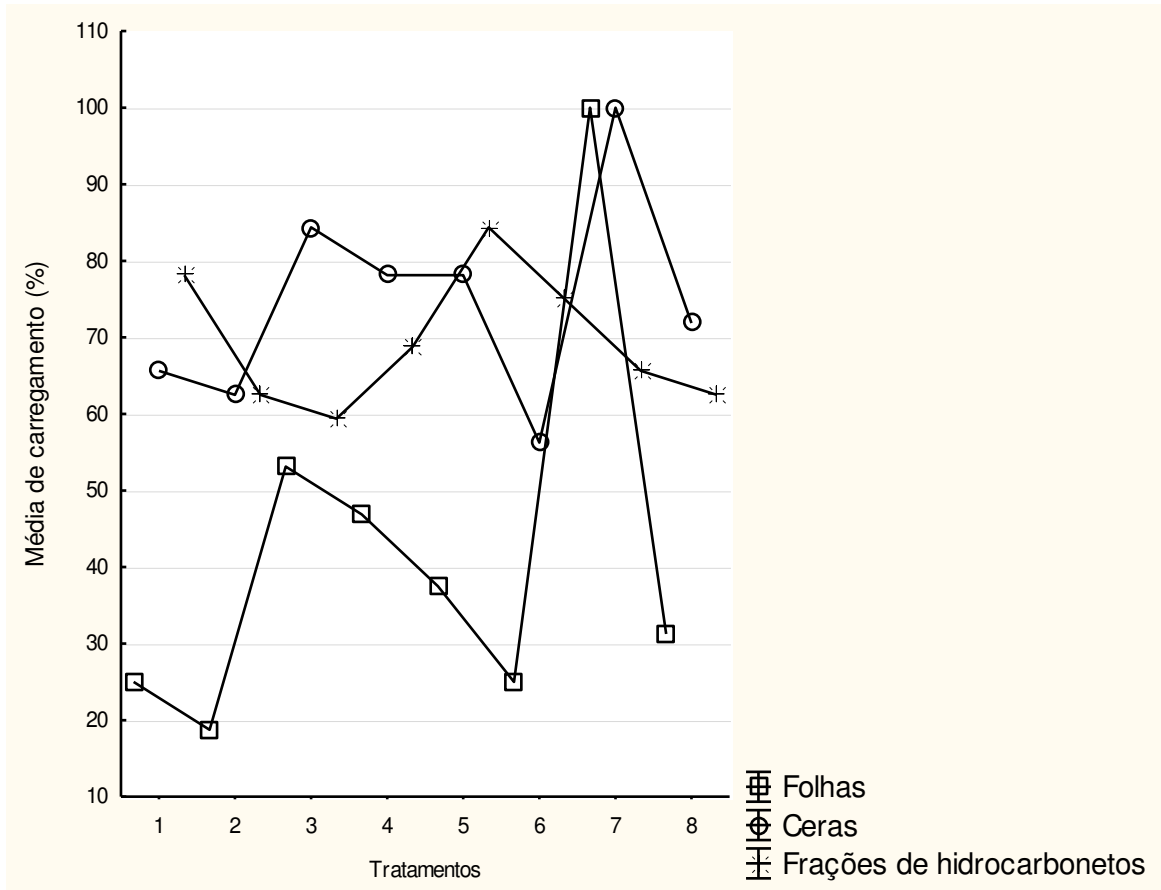
Folhas	7	1	3	4	5	8	2	6
Extratos	7	3	4	1	2	5	8	6

**Legenda:** Tratamentos - *Tocoyena formosa* nova (1); *Tocoyena formosa* senescente (2); *Virola sebifera* nova (3); *Virola sebifera* senescente (4); *Schefflera vinosa* nova (5); *Schefflera vinosa* senescente (6); *Acalypha wilkesiana* nova (7) e Discos de papel filtro (8).

Na figura 5, manteve-se o carregamento de *Acalypha wilkesiana* (100%), pois assim foi possível visualizar que em folhas continua tendo uma boa distinção entre os outros tratamentos e em ceras epicuticulares e frações de hidrocarbonetos a variação entre eles não é tão evidente. Para o carregamento dos distintos tratamentos, das folhas no decorrer do tempo, *A. wilkesiana*, foi o mais carregado significativamente quando comparado com os outros tratamentos, após 30 minutos de experimento.

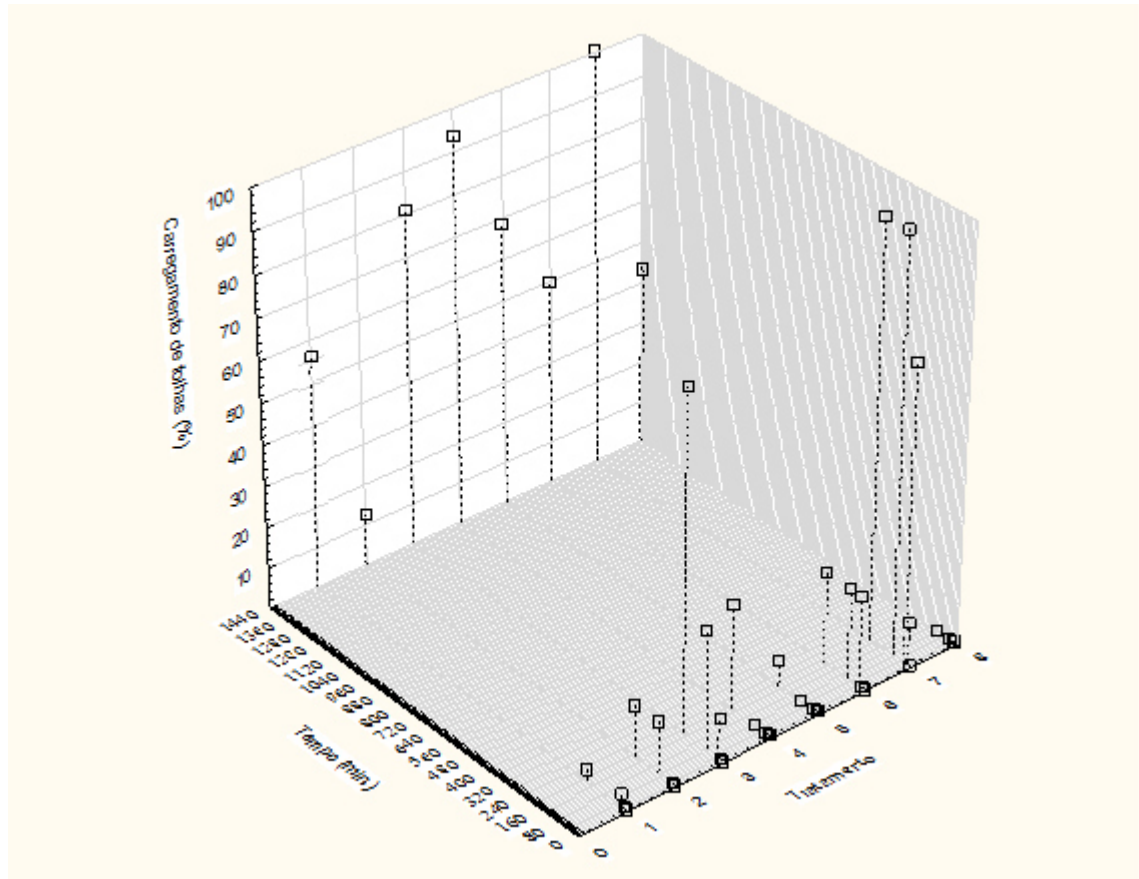


**Figura 4.** Taxa de carregamento para a primeira escolha, média de carregamento de distintos substratos por operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Folhas, ceras epicuticulares e frações de hidrocarbonetos presentes nos seguintes tratamentos: *Tocoyena formosa* nova (1); *Tocoyena formosa* senescente (2); *Virola sebifera* nova (3); *Virola sebifera* senescente (4); *Schefflera vinosa* nova (5); *Schefflera vinosa* senescente (6); *Acalypha wilkesiana* nova (7) e Discos de papel filtro (8).



**Figura 5.** Taxa de carregamento para a segunda escolha, média de carregamento de distintos substratos por operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Folhas, ceras epicuticulares e frações de hidrocarbonetos presentes nos seguintes tratamentos: *Tocoyena formosa* nova (1); *Tocoyena formosa* senescente (2); *Virola sebifera* nova (3); *Virola sebifera* senescente (4); *Schefflera vinosa* nova (5); *Schefflera vinosa* senescente (6); *Acalypha wilkesiana* nova (7) e Discos de papel filtro (8).

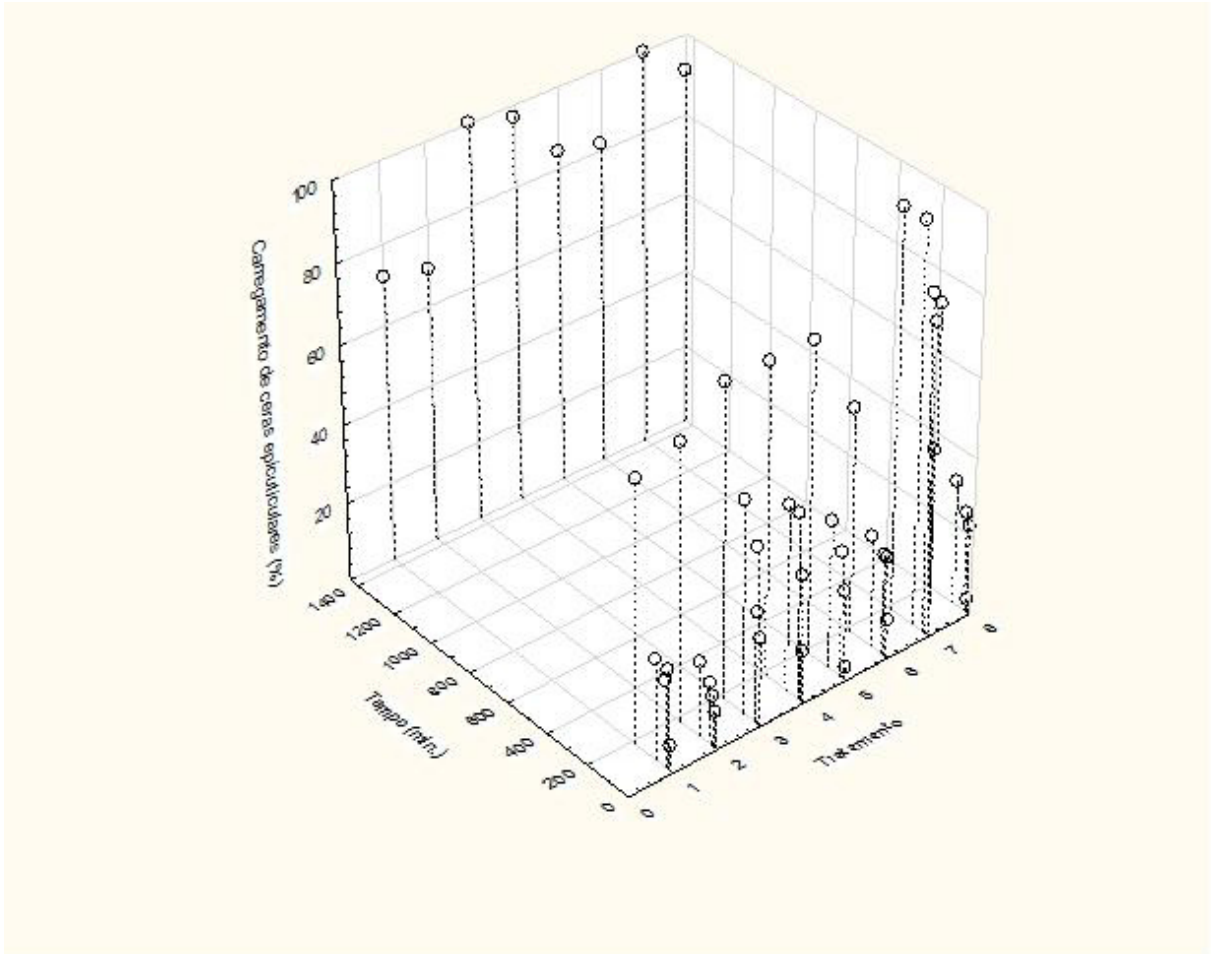
Para os fragmentos de discos foliares, apenas os tratamentos 4 e 5 (*Virola sebifera* nova esenescente) foram bastante carregados, no momento da avaliação do experimento, em que ocorreu a primeira escolha, ou seja, quando o tratamento 7 (*Acalypha wilkesiana*) foi totalmente carregado. Porém, após 24 horas, apenas fragmentos foliares de *Tocoyena formosa* senescentes (2) e Discos de papel filtro (8) foram pouco carregados, 12.5% e 43.75% respectivamente. As operárias demoraram em média 83 minutos para carregarem um primeiro tratamento em sua totalidade e 182 minutos para carregarem um segundo de sua preferência (Figura 6).



**Figura 6.** Média de carregamento de distintas folhas por operárias de *A. sexdens rubropilosa* no decorrer do tempo: 10, 20, 30, 83 ( $\bar{X}$  do tempo de Primeira escolha das repetições), 182 ( $\bar{X}$  do tempo de Segunda escolha das repetições) e 1440 minutos (24 horas) para as quatro colônias de formigas estudadas. **Tratamentos:** *Tocoyena formosa* nova (1); *Tocoyena formosa* senescente (2); *Virola sebifera* nova (3); *Virola sebifera* senescente (4); *Schefflera vinosa* nova (5); *Schefflera vinosa* senescente (6); *Acalypha wilkesiana* nova (7) e Discos de papel filtro (8).

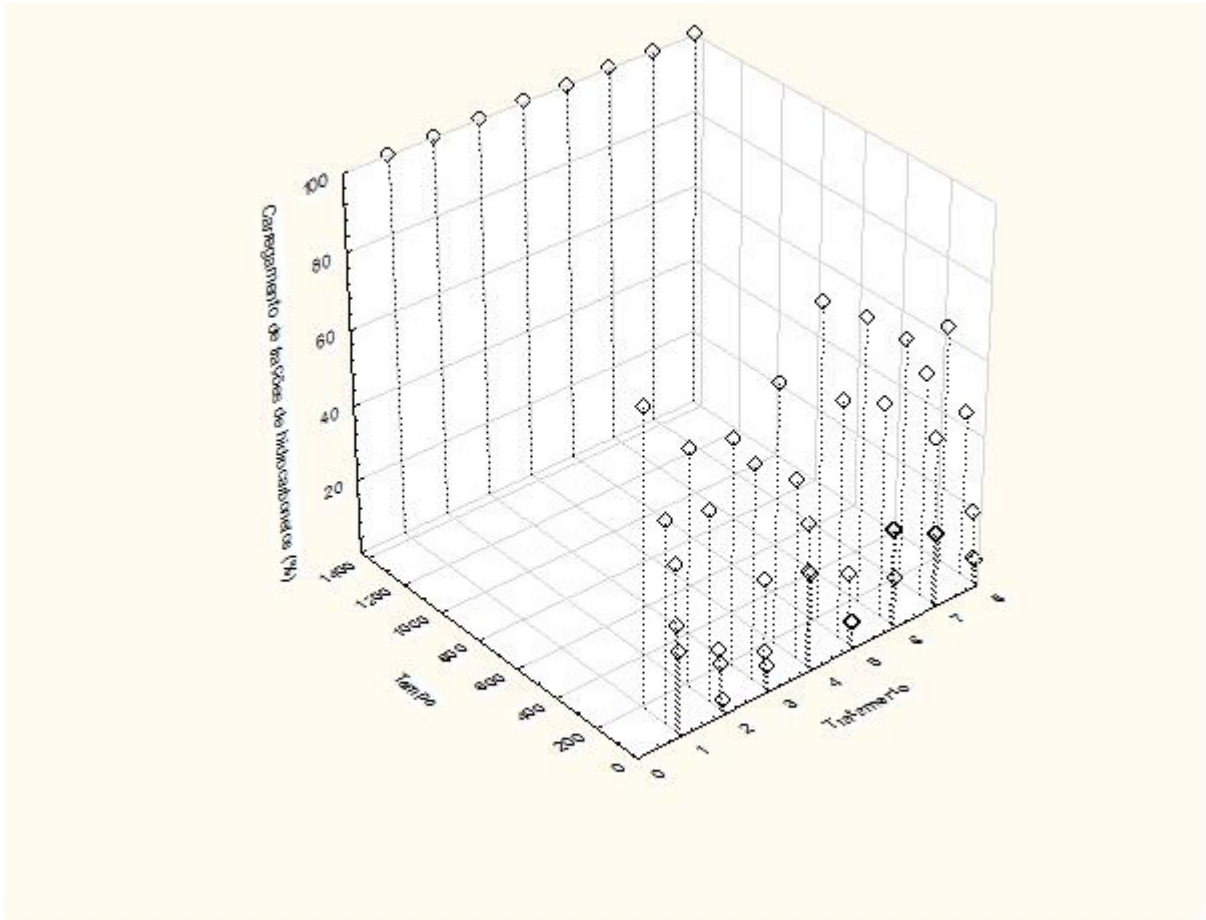
Para os extratos de ceras epicuticulares, não ocorreu diferença entre o carregamento dos tratamentos durante as observações ao longo do tempo ( $F=0.886$ ;  $p=0.681$ ). O primeiro tratamento a ser carregado foi em média 35 minutos e 69 minutos para o carregamento total de um segundo. Porém, quando se analisa apenas o fator tempo e carregamento, sem especificar os tratamentos, ele difere entre si destacando-se que após 24 horas, todos os tratamentos foram bastante carregados ( $F= 44.869$ ;  $p<0.001$ ) quando comparados com os tempos avaliados (Figura 7).





**Figura 7.** Média de carregamento de distintas ceras epicuticulares por operárias de *A. sexdens rubropilosa* no decorrer do tempo: 10, 20, 30, 35 ( $\bar{X}$  do tempo de Primeira escolha das repetições), 39 ( $\bar{X}$  do tempo de Segunda escolha das repetições) e 1440 minutos (24 horas) para as quatro colônias de formigas estudadas. **Tratamentos:** *Tocoyena formosa* nova (1); *Tocoyena formosa* senescente (2); *Virola sebifera* nova (3); *Virola sebifera* senescente (4); *Schefflera vinosa* nova (5); *Schefflera vinosa* senescente (6); *Acalypha wilkesiana* nova (7) e Discos de papel filtro (8).

No carregamento das diferentes frações de hidrocarbonetos não ocorreu diferenças entre os tratamentos ( $F=0.138$ ;  $p=1.619$ ), porém sim, com relação aos tempos avaliados ( $F=60.355$ ;  $p<0.001$ ), as apresentações de até 30 minutos tiveram um carregamento baixo, quando essas frações foram apresentadas para as operárias. Não ocorreu a exploração de um determinado tratamento, entretanto elas passaram um período explorando todos os fragmentos na arena de forrageamento. No entanto, após este período um dos substratos foi em média totalmente carregado e em média aos 35 minutos um segundo tratamento foi totalmente levado para a arena do fungo. Após 24 horas todos os tratamentos tiveram um carregamento de 100% (Figura 8).

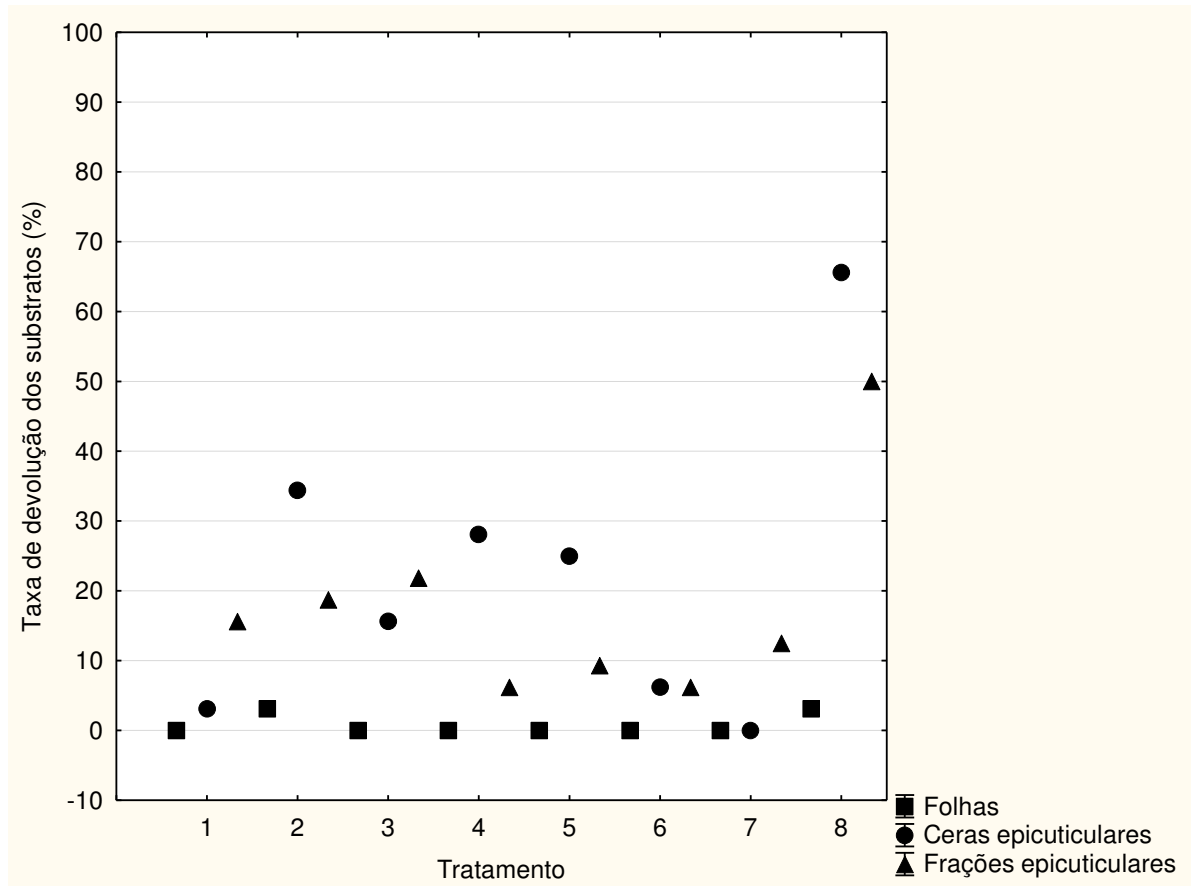


**Figura 8.** Média de carregamento de distintas frações de hidrocarbonetos epicuticulares por operárias de *A. sexdens rubropilosa* no decorrer do tempo: 10, 20, 30 (X̄ do tempo de Primeira escolha das repetições), 35 (X̄ do tempo de Segunda escolha das repetições) e 1440 minutos (24 horas) para as quatro colônias de formigas estudadas. **Tratamentos:** *Tocoyena formosa* nova (1); *Tocoyena formosa* senescente (2); *Virola sebifera* nova (3); *Virola sebifera* senescente (4); *Schefflera vinosa* nova (5); *Schefflera vinosa* senescente (6); *Acalypha wilkesiana* nova (7) e Discos de papel filtro (8).

Foi analisado se existe uma correlação entre os substratos e para o carregamento verificou-se que para a primeira escolha eles não se correlacionaram (folhas e extratos:  $p=0.0716$ ; folhas e frações:  $p=0.885$ ; extratos e frações:  $p=0.885$ ), já para a segunda, ficou clara a alta associação, quase 89% entre o carregamento de folhas e extratos ( $p= 0.000$ ), enquanto que para frações, quando associada com extratos,  $p=0.537$  e para folhas  $p=0.619$  não foi significativa essa correlação.

Após 24 horas, a taxa de recusa das folhas, ou seja, fragmentos deste substrato no lixo foram baixos, na média das colônias estudadas. Porém os outros substratos (extratos de ceras

epicuticulares e frações de hidrocarbonetos) apresentaram mais inertes (tratamentos) na câmara de lixo diferindo das folhas ( $p<0.001$ ) e dos tratamentos entre si ( $p=0.002$ ), sendo os fragmentos de papel filtro (tratamento 8) o mais rejeitado, descartado na câmara de lixo (Figura 9).



**Figura 9.** Recusa de distintos substratos oferecidos para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. **Legenda:** Tratamentos - *Tocoyena formosa* nova (1); *Tocoyena formosa* senescente (2); *Virola sebifera* nova (3); *Virola sebifera* senescente (4); *Schefflera vinosa* nova (5); *Schefflera vinosa* senescente (6); *Acalypha wilkesiana* nova (7) e Discos de papel filtro (8).

No processamento e incorporação das folhas, a média de formigas desempenhando determinado ato comportamental foi maior no tratamento 7 (*Acalypha wilkesiana*) ( $F=5.875$ ;  $p<0.001$ ), para todos os atos descritos quando comparados com os outros tratamentos durante as observações, seguido por fragmentos foliares de *Virola Sebifera* nova (Tabela 2).

Em relação às ceras epicuticulares a média de formigas desempenhando os comportamentos continuou sendo maior no tratamento 7, o qual dispõe de mais formigas para processar os extratos, entretanto, o ato de mastigar e incorporar não diferiu ( $F=1.026$ ;

p=0.413), pois o tempo máximo de observações foi insuficiente para descrever tal ato (Tabela 3).

**Tabela 2.** Média de operárias de *A. sexdens rubropilosa* desempenhando algum ato comportamental em função dos tratamentos foliares ofertados, durante os tempos amostrados (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 minutos).

COLÔNIAS	Segurar	Repicar	Lamber	Mastigar e incorporar	Tratamento
C1	0 ± 0	1.6 ± 2.05	4 ± 5.16	0 ± 0	
C2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C4	0 ± 0	2.1 ± 2.378	2.5 ± 2.75	0 ± 0	
<b>Ȫ OPERÁRIAS</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0.93 ± 1.78</b>	<b>1.62 ± 3.30</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>1</b>
C1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
<b>Ȫ OPERÁRIAS</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>2</b>
C1	0.70 ± 1.34	13.10 ± 12.52	20.70 ± 12.67	1.40 ± 3.27	
C2	0.9 ± 2.23	6.90 ± 6.71	15.18 ± 9.33	0.30 ± 0.95	
C3	0 ± 0	4.54 ± 1.86	6.18 ± 4.47	0 ± 0	
C4	0 ± 0	16.80 ± 11.62	13.70 ± 6.55	0.2 ± 0.632	
<b>Ȫ OPERÁRIAS</b>	<b>0.39 ± 1.30</b>	<b>10.20 ± 10.06</b>	<b>13.90 ± 9.96</b>	<b>0.46 ± 1.73</b>	<b>3</b>
C1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C4	0 ± 0	12.00 ± 7.78	12.10 ± 7.68	0 ± 0	
<b>Ȫ OPERÁRIAS</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>2.93 ± 6.39</b>	<b>2.95 ± 6.40</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>4</b>
C1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C4	0.10 ± 0.32	5.50 ± 5.13	8.40 ± 5.23	0 ± 0	
<b>Ȫ OPERÁRIAS</b>	<b>0.03 0.16</b>	<b>1.38 3.45</b>	<b>2.10 4.46</b>	<b>0 0</b>	<b>5</b>
C1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
<b>Ȫ OPERÁRIAS</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>6</b>
C1	8.30 ± 9.39	22.40 ± 22.14	43.80 ± 38.59	14.10 ± 24.48	
C2	0.80 ± 1.23	24.90 ± 7.48	35.90 ± 14.53	17.50 ± 22.17	
C3	0.40 ± 0.70	13.90 ± 8.65	13.20 ± 5.88	0.40 ± 0.97	
C4	0 ± 0	15.90 ± 7.11	23.50 ± 7.78	7.60 ± 13.38	
<b>Ȫ OPERÁRIAS</b>	<b>2.38 ± 5.74</b>	<b>19.28 ± 13.26</b>	<b>29.10 ± 23.55</b>	<b>9.90 ± 18.36</b>	<b>7</b>
C1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
<b>Ȫ OPERÁRIAS</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>8</b>

**Legenda.** Tratamentos: *Tocoyena formosa* nova (1); *Tocoyena formosa* senescente (2); *Virola sebifera* nova (3); *Virola sebifera* senescente (4); *Schefflera vinosa* nova (5); *Schefflera vinosa* senescente (6); *Acalypha wilkesiana* nova (7) e Discos de papel filtro (8).

**Tabela 3.** Média de operárias de *A. sexdens rubropilosa* desempenhando algum ato comportamental em função dos tratamentos de extratos de ceras epicuticulares ofertados, durante os tempos amostrados (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 minutos).

CÔLONIAS	Segurar	Repicar	Lamber	Mastigar e incorporar	Tratamento
C1	0 ± 0	0 ± 0	0.5 ± 0.85	0 ± 0	<b>1</b>
C2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C3	0.1 ± 0.32	1 ± 1	1.4 ± 0.97	0 ± 0	
C4	0.3 ± 0.68	1.3 ± 1.34	6.2 ± 3.88	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0.1 ± 0.38</b>	<b>0.33 ± 0.86</b>	<b>2.03 ± 3.17</b>	<b>0 0</b>	
C1	0 ± 0	0.1 ± 0.32	2.2 ± 3.74	0.2 ± 0.42	<b>2</b>
C2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0.00	0 ± 0	
C3	0.3 ± 0.95	0.3 ± 0.95	3 ± 1.83	0 ± 0	
C4	0.2 ± 0.63	1.7 ± 2.06	6.3 ± 5.01	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0.13 ± 0.47</b>	<b>0.525 ± 1.64</b>	<b>2.875 ± 4.79</b>	<b>0.05 ± 0.35</b>	
C1	0 ± 0	0 ± 0	2.78 ± 3.01	0 ± 0	<b>3</b>
C2	0 ± 0	0 ± 0	0.10 ± 0.32	0 ± 0	
C3	0 ± 0	1 ± 1.67	1.64 ± 1.03	0.09 ± 0.30	
C4	0.2 ± 0.42	2.7 ± 1.95	7.10 ± 3.64	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0.13 ± 0.56</b>	<b>0.53 ± 1.30</b>	<b>2.88 ± 3.88</b>	<b>0.05 ± 0.22</b>	
C1	0.1 ± 0.32	0.8 ± 0.92	3.8 ± 2.35	0 ± 0	<b>4</b>
C2	0.1 ± 0.32	1.5 ± 1.08	3.7 ± 2.41	0 ± 0	
C3	0.1 ± 0.32	0.5 ± 1.08	2.1 ± 1.10	0 ± 0	
C4	0 ± 0	1.8 ± 1.48	5.6 ± 4.58	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0.05 ± 0.22</b>	<b>0.93 ± 1.66</b>	<b>2.88 ± 3.48</b>	<b>0.02 ± 0.16</b>	
C1	0 ± 0	1 ± 2.11	0 ± 0.00	0 ± 0	<b>5</b>
C2	0 ± 0	1.8 ± 1.40	4.3 ± 1.70	0 ± 0	
C3	0 ± 0	0.6 ± 0.84	1.7 ± 1.16	0 ± 0	
C4	0.10 ± 0.32	1.00 ± 1.63	5.70 ± 2.21	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0.03 ± 0.16</b>	<b>0.85 ± 1.29</b>	<b>3.18 ± 2.62</b>	<b>0 ± 0</b>	
C1	0 ± 0	0 ± 0	0.8 ± 1.48	0 ± 0	<b>6</b>
C2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0.00	0 ± 0	
C3	0 ± 0	0.9 ± 1.29	1.7 ± 0.82	0 ± 0	
C4	0.2 ± 0.42	1.3 ± 1.57	5 ± 3.53	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0.05 ± 0.22</b>	<b>0.55 ± 1.13</b>	<b>1.88 ± 2.69</b>	<b>0 ± 0</b>	
C1	0.7 ± 0.82	2.8 ± 2.70	8.9 ± 3.04	0 ± 0	<b>7</b>
C2	0.5 ± 0.71	3.2 ± 2.20	9.7 ± 2.95	0 ± 0	
C3	0 ± 0	0.9 ± 0.88	8.8 ± 4.24	0 ± 0	
C4	0.1 ± 0.32	3.6 ± 2.63	10.4 ± 2.72	0.3 ± 0.949	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0.33 ± 0.62</b>	<b>2.63 ± 2.38</b>	<b>9.45 ± 3.23</b>	<b>0.08 ± 0.47</b>	
C1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	<b>8</b>
C2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
C3	0 ± 0	0 ± 0	0.8 ± 0.91	0 ± 0	
C4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0.52 ± 0.96</b>	<b>0 ± 0</b>	

**Legenda.** Tratamentos: *Tocoyena formosa* nova (1); *Tocoyena formosa* senescente (2); *Virola sebifera* nova (3); *Virola sebifera* senescente (4); *Schefflera vinosa* nova (5); *Schefflera vinosa* senescente (6); *Acalypha wilkesiana* nova (7) e Discos de papel filtro (8).

Quanto aos fragmentos de papel filtro contendo as diferentes frações de hidrocarbonetos a média de formigas processando e incorporando não diferiu no ato comportamental de repicar ( $F=0.424$ ;  $p=0.884$ ), sendo que a média de formigas nos tratamentos variou de  $1.23\pm 1.07$  (*Schefflera vinosa* senescente) a  $2\pm 2.18$  (*Virola sebifera* senescente), porém o de lambar entre os tratamentos diferiu ( $F=4.862$ ;  $p<0.001$ ), foi frequente para todos os tratamentos, menos no controle (tratamento 8) em que as formigas não exibiram esse ato comportamental. Segurar e mastigar e incorporar não foram comportamentos observados para este substrato (Tabela 4).

Assim, ao se comparar o processamento dos distintos substratos, após 110 minutos, já se observa incorporação total dos fragmentos foliares no fungo simbiote de *Acalypha wilkesiana* em uma das repetições, tempo este não suficiente para a incorporação dos outros substratos (fragmentos de papel filtro contendo extratos de ceras epicuticulares e frações de hidrocarbonetos).

O ato de lambar foi o comportamento mais frequente para todos os substratos no decorrer do tempo, sendo  $501\pm 12.80$  a média total de formigas das quatro colônias para folhas,  $266.75\pm 5.67$  para ceras e  $174\pm 5.72$  para as frações de hidrocarbonetos. O número total de formigas para o processamento das folhas no simbiote foi maior quando comparado com os outros substratos, durante o tempo amostrado, sendo em média  $983\pm 9.24$  formigas observadas desempenhando algum ato comportamental, independente do tratamento, sendo  $345.50\pm 2.48$  para ceras e  $209.25\pm 4.24$  para as frações dos hidrocarbonetos.

**Tabela 4.** Média de operárias de *A. sexdens rubropilosa* desempenhando algum ato comportamental em função dos tratamentos de frações de hidrocarbonetos extraídas de diferentes ceras epicuticulares, durante os tempos amostrados (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 minutos).

CÔLONIAS	Segurar	Repicar	Lamber	Mastigar e incorporar	Tratamento
C1	0 ± 0	0.9 ± 0.99	3.9 ± 3.38	0 ± 0	<b>1</b>
C2	0.3 ± 0.67	1.1 ± 1.45	4.7 ± 2.63	0 ± 0	
C3	0 ± 0	3.4 ± 3.2	9.2 ± 3.19	0 ± 0	
C4	0 ± 0	1.7 ± 0.95	9.8 ± 3.91	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0.08 ± 0.35</b>	<b>1.78 ± 2.07</b>	<b>6.9 ± 4.14</b>	<b>0 ± 0</b>	
C1	0.30 ± 0.95	3 ± 2.06	11 ± 2.54	0.3 ± 0.67	<b>2</b>
C2	0.30 ± 0.95	2.7 ± 2.16	11 ± 2.54	0.27 ± 0.65	
C3	0.09 ± 0.29	1.92 ± 1.30	8.69 ± 5.06	0.06 ± 0.2	
C4	0 ± 0	2.4 ± 1.26	9.2 ± 3.61	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0.08 ± 0.47</b>	<b>1.95 ± 1.65</b>	<b>8.1 ± 4.79</b>	<b>0.08 ± 0.35</b>	
C1	0 ± 0	0.2 ± 0.42	4.1 ± 2.08	0 ± 0	<b>3</b>
C2	0 ± 0	2.44 ± 2.2	10.11 ± 5.32	0.11 ± 0.32	
C3	0 ± 0	1.45 ± 1.37	10.91 ± 4.61	0 ± 0	
C4	0 ± 0	1.6 ± 1.71	11.7 ± 4.37	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>1.37 ± 1.67</b>	<b>9.49 ± 5.16</b>	<b>0.02 ± 0.16</b>	
C1	0.3 ± 0.48	1.9 ± 1.2	10.4 ± 7.37	0 ± 0	<b>4</b>
C2	0 ± 0	2.8 ± 1.81	11.1 ± 4.84	0.1 ± 0.32	
C3	0 ± 0	1.56 ± 1.26	10.56 ± 4.58	0 ± 0	
C4	0 ± 0	1.9 ± 3.63	8.8 ± 5.2	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0.08 ± 0.27</b>	<b>2 ± 2.18</b>	<b>10.05 ± 5.45</b>	<b>0.03 ± 0.16</b>	
C1	0 ± 0	0.9 ± 1.1	3.8 ± 3.36	0 ± 0	<b>5</b>
C2	0 ± 0	2.2 ± 3.29	8.9 ± 5.3	0 ± 0	
C3	0 ± 0	1.2 ± 1.22	8.6 ± 4.92	0 ± 0	
C4	0 ± 0	1.2 ± 1.23	8.9 ± 4.86	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>1.38 ± 1.93</b>	<b>7.55 ± 5.06</b>	<b>0 ± 0</b>	
C1	0 ± 0	0.33 ± 0.5	2.4 ± 2.12	0 ± 0	<b>6</b>
C2	0.1 ± 0.32	1.5 ± 1.35	7.5 ± 5.18	0 ± 0	
C3	0 ± 0	1.4 ± 0.97	7.8 ± 4.34	0 ± 0	
C4	0 ± 0	1.6 ± 0.97	9.6 ± 2.01	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0.03 ± 0.16</b>	<b>1.23 ± 1.07</b>	<b>6.9 ± 4.33</b>	<b>0 ± 0</b>	
C1	0.1 ± 0.32	0.5 ± 1.08	2.9 ± 2.73	0 ± 0	<b>7</b>
C2	0.1 ± 0.32	1.7 ± 2	5.8 ± 1.81	0 ± 0	
C3	0 ± 0	1.3 ± 1.7	9.8 ± 4.05	0 ± 0	
C4	0 ± 0	2.1 ± 1.1	8.3 ± 2.06	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0.05 ± 0.22</b>	<b>1.4 ± 1.58</b>	<b>6.7 ± 3.78</b>	<b>0 ± 0</b>	
C1	0 ± 0	1.11 ± 2.26	1.33 ± 1.14	0 ± 0	<b>8</b>
C2	0.2 ± 0.42	1.7 ± 1.83	7.4 ± 2.8	0 ± 0	
C3	0 ± 0	0.9 ± 0.88	4.4 ± 2.84	0 ± 0	
C4	0 ± 0	1.6 ± 0.7	3.3 ± 2.36	0 ± 0	
<b>Ī OPERÁRIAS</b>	<b>0.05 ± 0.22</b>	<b>1.38 ± 1.53</b>	<b>4.08 ± 3.22</b>	<b>0 ± 0</b>	

**Legenda.** Tratamentos: *Tocoyena formosa* nova (1); *Tocoyena formosa* senescente (2); *Virola sebifera* nova (3); *Virola sebifera* senescente (4); *Schefflera vinosa* nova (5); *Schefflera vinosa* senescente (6); *Acalypha wilkesiana* nova (7) e Discos de papel filtro (8).

#### 2.1.4. Discussão

*Acalypha wilkesiana* foi a planta mais atrativa quando os tratamentos foram dispostos na arena de forrageamento, independente da posição. Foi o primeiro substrato explorado tanto para discos foliares como para extratos de ceras epicuticulares, o qual as operárias demonstraram interesse e carregaram em sua totalidade, isso corroborou com os dados já observados por Nagamoto et al. (2009). No presente estudo verificou-se que o estímulo olfatório foi determinante para a escolha de um primeiro material a ser forrageado, ficando clara a atratividade de discos foliares e ceras de *A. wilkesiana*, independente da posição em que ela ocupava na arena de forrageamento.

Uma característica discutida na seletividade das plantas pelas formigas cortadeiras é em relação aos aspectos físicos, como a dureza das folhas, que um fator de segunda seleção após a influência dos compostos químicos (Verza et al. 2007). A mais rígida ofertada foi a *Tocoyena formosa*, sendo os discos foliares senescentes desta planta os menos carregados.

Contudo, ficou claro neste estudo que a seletividade a priori se deu por estímulo químico e não físico no momento da escolha do substrato, pois as operárias direcionaram-se até a planta atrativa independente da posição e de tocá-la. Sendo assim, pode-se inferir a existência de um composto químico que confere atratividade para *Acalypha wilkesiana*, porém sugere-se que não pode ser um hidrocarboneto, já que quando ofertadas as frações de cada planta separadamente todas foram atrativas, não diferindo estatisticamente.

As plantas de Cerrado, nativas do Brasil, também coevoluiram com as formigas cortadeiras, e conseqüentemente estes vegetais podem dispor de barreiras químicas na tentativa de evitar o corte delas pelas operárias. Já *Acalypha wilkesiana*, uma planta exótica, originária das Ilhas do Pacífico, sendo encontrada no Brasil sob condição cultivável por sua folhagem ornamental (Lorenzi, 1995); pode simplesmente não apenas possuir compostos atrativos para as formigas, mas também devido a inexistência de compostos repelentes tornam-a tão carregada por estes insetos.

No bioensaio ofertado com diferentes fragmentos foliares para as operárias, ocorreu a incorporação também de discos de papel filtro, ou seja, o tratamento testemunha, sem nenhum atrativo, sendo de 43.75% o carregamento, mesmo as formigas tendo fragmentos foliares como opção de forrageamento (*Tocoyena formosa* senescente). Estes dados corroboram com os obtidos de Caffarini et al. (2006) e Mudd et al. (1978), em que a ausência de compostos repelentes pode ser mais importante do que a presença de estimulantes específicos e reforçam



a hipótese de que folhas de *Tocoyena formosa* senescente, as menos carregadas, possuem compostos que podem ser tóxicos às colônias.

*Schefflera vinosa* foi a segunda planta menos carregada, tanto jovens quanto senescentes, apesar da média de seu carregamento em 24 horas ter sido de 68.75% e 50% respectivamente. Salatino et al. (1998), em estudos com extratos das ceras foliares desta planta, porém antes denominada como *Didymopanax vinosum*, observaram o baixo carregamento de extratos dos compostos isolados das ceras epicuticulares apenas após a 50ª apresentação; já no presente trabalho, os extratos e as frações de hidrocarbonetos foram bem aceitas, contudo, fato este observado para uma apresentação e quatro repetições (colônias).

De acordo com a hipótese de Stradling e Powell (1986), em que a variação de recursos carregados para o ninho pelas operárias, atende as necessidades nutricionais individuais, da colônia e do fungo simbiote, além de evitar níveis elevados de compostos tóxicos secundários, condiz com os resultados de Salatino, já que as operárias começaram a rejeitar as ceras de *Schefflera vinosa* somente após a 50ª apresentação, ou seja, os nutrientes fornecidos poderiam estar começando a produzir efeitos deletérios devido aos compostos impróprios presentes tornarem-se em grande quantidade.

Para o presente estudo, às ceras e às frações de hidrocarbonetos de *Schefflera vinosa* elas lamberem estes inertes por um período, sendo certamente nutritivos a elas. Depois de 24 horas, ocorreu um alto carregamento desses substratos, mas com recusa de 25% para extratos impregnados com ceras epicuticulares de *S. vinosa* novas e de 5% para *S. vinosa* senescentes. No caso das frações de hidrocarbonetos obtidas a partir das ceras epicuticulares, 9% de recusa foi para *S. vinosa* novas e 5% para *S. vinosa* senescentes.

Quando comparados os três substratos (folhas, ceras e frações de hidrocarbonetos), o comportamento de lambar para ceras e frações obtiveram os maiores registros de operárias executando este ato, além de se observar que o tempo para incorporar as folhas no simbiote foi mais rápido. Isso, conseqüentemente, porque as operárias passaram mais tempo lambendo os outros substratos, demorando mais para que os mesmos fossem incorporados. Esses dados são condizentes com os obtidos por Diniz (2000), pois as formigas retiraram as ceras presentes nas folhas e incorporaram o restante no fungo simbiote. Entretanto, após retirar os compostos dos fragmentos de papel filtro, onde foram impregnados os extratos com ceras epicuticulares e as frações, alguns inertes foram carregados para o lixo, provavelmente por ausência de compostos nutritivos para o simbiote.

Quando as operárias tiveram o primeiro contato com as frações de hidrocarbonetos elas exploraram a arena de forrageamento, todos os tratamentos por um período, antenando-os e depois iniciaram o carregamento, sendo que neste tipo de substrato não se observou preferência por nenhum, sendo todos atrativos, exceto o tratamento 8, único inerte sem nenhum atrativo, que foi carregado para a arena de fungo, contudo a maioria ficou abandonado no local, ou após 24 horas foram carregadas para o lixo.

Chippendale (1978) postulou que os insetos utilizam os hidrocarbonetos para aumentar seu tempo de sobrevivência ou aumentar a fertilidade. Talvez seja esse o motivo para as frações de hidrocarbonetos serem atrativas para as formigas cortadeiras comprovado pelo alto carregamento e o comportamento de lambar observado, ficando evidente de que as mesmas os utilizaram para seu benefício.

Assim, este trabalho conclui que os hidrocarbonetos são atrativos para operárias de *A. sexdens rubropilosa*. A possível ausência de compostos repelentes e a presença de um composto atrativo presentes nas ceras epicuticulares das folhas de *Acalypha wilkesiana* levam as formigas a serem seletivas a tal substrato.

### 2.1.5. Referências Bibliográficas

- ANDRADE, A. P. P et al. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology** v.40, p.293-306, 2002.
- CAFFARINI, P.; CARRIZO, P.; PELICANO, A. Extractos cítricos como atrayentes para cebos hormiguitas con substancias naturales. **Rev. FCA UNCuyo**, Tomo XXXVIII, v.1, p.19-26, 2006.
- CHIPPENDALE, G.M. The function of carbohydrates in insect life process. In: Kockstein, G.M. **Biochemistry of insects**. New York Academic Press, p.2-54, 1978.
- DINIZ, E.A. 2000. **Comportamento de preparação do substrato vegetal e cuidado com a rainha de *Atta sexdens***. Rio Claro, SP, UNESP. Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas) 37 p.
- KREBS, J. R.; DAVIES, N.B. **Introdução à ecologia comportamental**. 3ª ed. Ateneu Editora, São Paulo, 1993.
- LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J.M. Olfactory responses of the leaf-cutting ants (*A. cephalotes* L) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich.) (Hymenoptera: Formicidae) in the laboratory. **Bulletin of Entomological Research** v.68, p.273-282, 1978.
- LORENZI, H.; SOUZA H.M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3 edição, Nova Odessa: Editora Plantarum. 720 p., 1995.
- MUDD, A.D.J.; PEREGRINE, D.J.; CHERRETT, J.M. The chemical basis for the use of citrus pulp as a fungus garden substrate by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich.) (Hymenoptera: Formicidae). **Bulletin of Entomological Research** v.68, p.673-685, 1978.
- NAGAMOTO, N. et al. Differentiation in Selection of Dicots and Grasses by the Leaf-Cutter Ants *Atta capiguara*, *Atta laevigata* and *Atta sexdens rubropilosa*. **Sociobiology** v.54, n.1, p.1-12, 2009.

- PETACCI, F. **Hidrocarbonetos cuticulares e epicuticulares de plantas relacionadas à formigas cortadeiras; Constituintes químicos de *Spathodea campanulata***. Tese de Doutorado em Química. Universidade Federal de São Carlos. 82p, 1997.
- ROCES, F. Olfactory conditioning during the recruitment process in leaf-cutting ant. **Oecologia** v.83, p.261-262, 1990.
- SALATINO, A. et al. Effect of constituents of the foliar wax of *Didymopanax vinosum* on the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomology Experimentalis et Applicata** v.86, p. 261-266, 1998.
- SAS 9.1 **The sas system-release 9.1**. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2002-2003.
- STATISTICA 10. **StatSoft**, Inc.version 10, 2010.
- STRADLING, D.J., POWELL, R.J. The colonizing of more highly productive fungus strains: a factor in the speciation of fungus-growing ants. **Experientia** v.42, p.962-964, 1986.
- SUGAYAMA, R.L.; SALATINO, A.. Ceras foliares - Possível defesa contra saúvas. **Ciência hoje** v.16, p.16-17, 1993.
- VERZA S.S et al. Influence of physical and chemical factors during foraging and culture of the symbiont fungus in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Insect Science** 14, p. 295-300, 2007.

## 2.2. Avaliação de interesse de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae) por tricomas de *Virola sebifera*.

### Resumo

Diversas teorias enfocam os motivos que determinam o forrageamento ou não de determinado substrato vegetal por operárias de formigas cortadeiras para seu benefício e/ou de seu simbionte. Fatores físicos e químicos das fontes vegetais têm sido descritos e suas influências na atratividade, fazendo com que as formigas façam uso ou não deste material podendo gerar diversas respostas comportamentais. Com relação aos tricomas, existe o enfoque como estrutura física no auxílio como suporte das operárias mínimas caroneiras, em cima das folhas, no retorno ao ninho quando o substrato vegetal é carregado pela forrageira, mas não enfocando se estas estruturas podem influenciar na escolha do vegetal. Em vista disso, o presente estudo teve como objetivo estudar o possível papel dos tricomas na atratividade das folhas de *Virola sebifera* para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Foram realizadas análises químicas dos constituintes e um teste de avaliação de interesse dos tricomas por estas operárias. Para isso, extratos obtidos a partir dos tricomas foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrômetro de Massas e tiveram seus compostos químicos descritos. Para avaliar a utilidade dos tricomas pelas formigas, ofertou-se para quatro repetições, ou seja, colônias distintas, seis tratamentos de *V. sebifera*, de maneira aleatória na arena de forrageamento: fragmentos de folhas jovens (1), fragmentos de folhas jovens com poucos tricomas (2), tricomas de folhas jovens (3), fragmentos de folha senescentes (4), fragmentos de folhas senescentes com poucos tricomas (5) e tricomas de folhas senescentes (6). Os constituintes químicos foram distintos nas estruturas foliares de *V. sebifera*, sendo o Triacotano (C30) o composto majoritário em tricomas de folhas jovens e para tricomas de folhas senescentes foi o Tetratriacontano (C34) de maior concentração. Verificou-se que as formigas preferencialmente carregaram o tratamento composto por folhas jovens com poucos tricomas ( $F= 5.14$ ;  $p=0.016$ ) e não carregaram fragmentos das folhas senescentes com poucos tricomas, além de se verificar que as operárias exploraram muito mais os tricomas jovens do que os velhos. Provavelmente, a seletividade da planta se deu devido à composição e à concentração dos compostos presentes em *V. sebifera* em distintos estágios foliares.

**Palavras chave:** forrageamento, formigas cortadeiras.

### 2.2.1. Introdução

A seleção de plantas é um mecanismo complexo que envolve diversos fatores, porém essa escolha vai desde o forrageamento até a incorporação do substrato pelo fungo simbiote. Outro ponto importante envolvido neste processo, são as trilhas para a coleta das plantas, em *Atta* sp. ocorre a utilização de trilhas químicas e físicas por operárias que fazem uso para ir até a fonte de recursos e retornar ao ninho, sendo que existe um compartilhamento de informações e juntamente com o polietismo etário garantem o sucesso do forrageamento.

Em *Virola sebifera* (Magnoniales), observou-se que é uma planta bem aceita para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, sendo suas folhas atrativas assim como as ceras epicuticulares e os hidrocarbonetos presentes (Experimento anterior, item 2.1). Petacci (1997) verificou que as folhas jovens foram mais atrativas que as adultas, apesar do experimento anterior não corroborar com os dados do pesquisador, pois ambas não diferiram.

No presente estudo analisou-se outra variável, a presença de tricomas, deste modo, questiona-se, se seriam os tricomas e seus compostos químicos o responsável pela atratividade. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o interesse das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* frente aos tricomas de *Virola sebifera*.

### 2.2.2. Material e Métodos

As folhas jovens (Figura 1) e senescentes de *Virola sebifera* Aubl foram coletadas no fragmento de Cerrado da UFSCAR- São Carlos e os tricomas (Figura 2) foram retirados por raspagem com o auxílio de um esteromicroscópio óptico e lâmina, com eles realizou-se extratos para a identificação e quantificação dos constituintes. Após análise prévia, optou-se por fazer os extratos em diclorometano, sendo as análises químicas realizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química, UFSCAR e os bioensaios comportamentais no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro.

A fim de escolher o solvente mais apropriado para a extração, inicialmente foi realizado um teste de solvente, explorando as diferentes polaridades dos mesmos. Por meio deste, o diclorometano mostrou-se o solvente mais eficiente para a extração e posteriores análises. Assim, para os extratos utilizou-se 500mg de tricomas de folhas jovens e a mesma quantidade para tricomas de folhas adultas em 5mL de diclorometano imersos por 30 segundos em um Banho Sonicador, Modelo B14. Posteriormente, foram analisados os extratos por Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrômetro de Massas (CG-EM), Modelo Shimadzu e determinados os constituintes presentes. As condições de rampa utilizadas foram: 100 °C/2min, 8°C/min, 200 °C durante 5 minutos, 8 °C/min, 300°C, durante 15 minutos. Uma temperatura do injetor foi de 320 °C e do detector de 100 °C.

Para o experimento de análise de interesse dos tricomas pelas operárias ofertou-se para quatro repetições, ou seja, colônias distintas de *Atta sexdens rubropilosa*, com volume de fungo aproximado de 1 litro, seis tratamentos de *Virola sebifera*, de maneira aleatória na arena de forrageamento (Figura 3), segundo metodologia proposta por Forti et al. (1993). Sendo estes tratamentos: fragmentos de folhas jovens (1), fragmentos de folhas jovens com poucos tricomas (2), tricomas presentes em folhas jovens (3), fragmentos de folha senescentes (4), fragmentos de folhas senescentes com poucos tricomas (5) e tricomas presentes em folhas senescentes (6). Para os tratamentos 2 e 5, os tricomas foram raspados com o auxílio de uma lâmina sob estereomicroscópio óptico, tentando ao máximo não danificar mecanicamente a folha, sendo ofertados 2 gramas aproximadamente de cada e para os fragmentos de folha (aproximadamente 1.0 x 1.0 cm cada), 5 pedaços por tratamento ofertado.

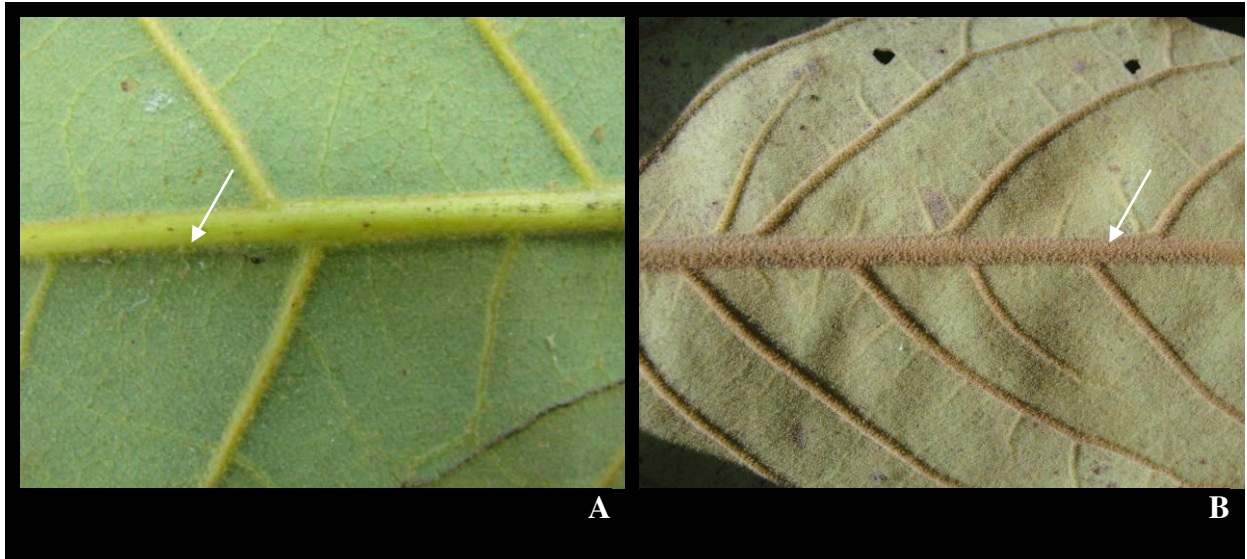
Antes do experimento as colônias permaneceram 24 horas em jejum (sem receberem substrato vegetal) e analisou-se quantitativamente após 60 minutos do oferecimento dos tratamentos, o número de fragmentos foliares carregados e se ocorreu interesse das operárias pelos tricomas por análise descritiva desde o oferecimento até 60 minutos quando o experimento foi finalizado. Após 24 horas observou-se o carregamento total ou não dos fragmentos foliares de *Virola sebifera* e dos tricomas com o auxílio de um esteromicroscópio óptico.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, em seguida foi realizada a Análise de Variância e o teste *a posteriori* de Tukey (Statística 10 e Bioestat, 2011).

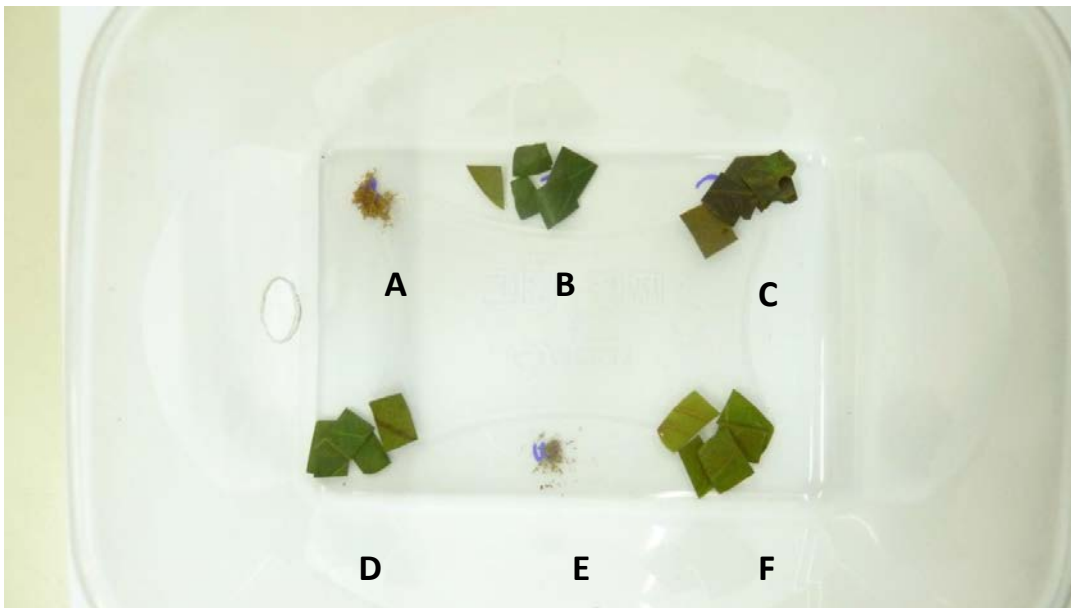


**Figura 1.** Folha jovem de *Virola sebifera*.





**Figura 2.** A. Tricomas presentes em folhas jovens de *Virola sebifera*; B. Tricomas presentes em folhas senescentes de *V. sebifera*.



**Figura 3.** Arena de forrageamento de *Atta sexdens rubropilosa* com os tratamentos de *Virola sebifera* dispostos aleatoriamente em uma das repetições do experimento: A- tricomas presentes em folhas senescentes (Tratamento 6); B – fragmentos de folhas jovens com poucos tricomas (Tratamento 2); C – fragmentos de folhas senescentes com poucos tricomas (Tratamento 5); D – fragmentos de folhas senescentes (Tratamento 4); E - tricomas presentes em folhas jovens (Tratamento 3); F – fragmentos de folhas jovens (Tratamento 1).

### 2.2.3. Resultados

Para a determinação dos constituintes presentes nos tricomas o método cromatográfico foi validado. A linearidade e sensibilidade foram verificadas, pois, houve dificuldade na quantificação e qualificação dos compostos devido a quantidade diminuta das concentrações.

Quando a faixa de concentração é muito baixa (1-5 ng/mL), observa-se uma diminuição na intensidade do sinal cromatográfico. No entanto, à medida que a concentração dos analitos aumenta, a intensidade dos picos aumenta significativamente. Esse aumento é linear para uma ampla faixa de concentração, aproximadamente 30 a 1000 ng/mL. Para concentrações mais elevadas (acima de 1000 ng/mL) a intensidade dos sinais apresenta um aumento discreto. Essa queda na linearidade sugere que tais concentrações já estariam extrapolando a faixa ótima de trabalho para os analitos em questão.

Nas análises em matrizes biológicas, para um método quantitativo apresentar boa linearidade, é necessário que o valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) seja superior a 0.99 para a quantificação. Nesse trabalho, os valores obtidos para esses coeficientes são superiores a esse mínimo, indicando que os modelos lineares estão bem ajustados, Tabela 1.

**Tabela 1.** Linearidade e Sensibilidade para os padrões em estudo e amostras de *Virola sebifera*.

<b>Padrão</b>	<b>Linearidade</b>	<b>Equação de ajuste</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>LD (ng)</b>	<b>LQ (ng)</b>
<b>Hexadecano</b>	0.1-2000	$y=(0.00408\pm 0.0001)x + (0.95\pm 0.05)$	0.99777	0.14	0.45
<b>Octadecano</b>	0.1-2000	$y=(0.00152\pm 0.00004)x + (0.30\pm 0.02)$	0.99827	0.15	0.46
<b>Eicosano</b>	0.1-2000	$y=(0.00455\pm 0.00007)x - (0.07\pm 0.03)$	0.99896	0.15	0.45
<b>Docosano</b>	0.1-2000	$y=(0.00258\pm 0.00005)x + (0.54\pm 0.02)$	0.99828	0.11	0.46
<b>Tetracosano</b>	0.1-2000	$y=(0.00087\pm 0.00001)x + (0.3\pm 0.01)$	0.99928	0.13	0.36
<b>Hexacosano</b>	0.1-2000	$y=(0.044\pm 0.001)x - (1.4\pm 0.5)$	0.99712	0.11	0.31
<b>Octacosano</b>	0.1-2000	$y=(0.00459\pm 0.00004)x + (0.11\pm 0.03)$	0.99955	0.11	0.32
<b>Triacotano</b>	0.1-2000	$y=(0.00465\pm 0.00005)x + (0.06\pm 0.04)$	0.99923	0.13	0.40
<b>Dotriacotano</b>	0.1-2000	$y=(0.00099\pm 0.00006)x - (0.17\pm 0.02)$	0.99826	0.19	0.55
<b>Tetratriacontano</b>	0.1-2000	$y=(0.00368\pm 0.00003)x + (0.46\pm 0.03)$	0.99934	0.18	0.56
<b>Hexariacontano</b>	0.1-2000	$y=(0.00107\pm 0.00001)x + (0.33\pm 0.01)$	0.99812	0.14	0.46
<b>Octatriacontano</b>	0.1-2000	$y=(0.00804\pm 0.0008)x + (1.95\pm 0.03)$	0.99854	0.18	0.49

**LD:** Limite de Detecção; **LQ:** Limite de Quantificação.

A sensibilidade do método foi avaliada, baseando-se nos valores de Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ), calculados a partir das análises realizadas com as amostras de referências negativas. Em relação a esse parâmetro, pode-se dizer que o método apresentou uma sensibilidade muito boa para todos os analitos estudados. Os constituintes encontrados estão demonstrados nas Tabelas 2 e 3 em que se observam hidrocarbonetos, ácidos graxos e cetonas.

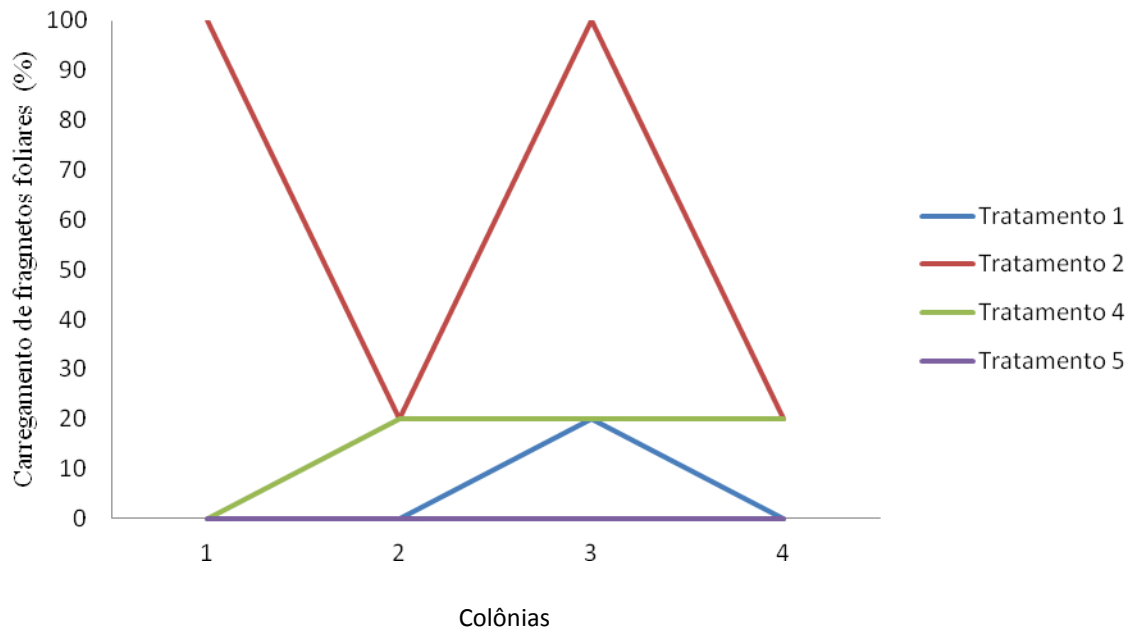
**Tabela 2.** Compostos presentes no extrato dos tricomas novos.

Nº	TR	Composto	m/z característico	Concentração (ppm)
1	20.063	Ácido hexadecanoico	60, 73, 129, 256	10.66
2	21.989	Ácido heptadecanoico	60, 73, 129	1.67
3	24.883	Octacosano (C28)	57, 71,85	1.21
4	26.450	Fitoesteróide da planta	-	16.70
5	27.920	Triacotano (C30)	57, 71,85	20.30
6	28.081	2-pentacosanona	135, 146, 366	4.54
7	29.479	Dotriacotano (C32)	57, 71,85	8.45

**Tabela 3.** Compostos presentes no extrato dos tricomas velhos.

N	TR	Composto	m/z característico	Concentração (ppm)
1	17.790	<i>o</i> -Toluenosulfonamida	90, 106, 171	1.66
2	18.394	<i>p</i> -Toluenosulfonamida	91, 155, 171	2.76
3	21.401	3,3,5-Trimetilciclohexil salicilato	69, 138, 262	1.06
4	22.250	Di octil éter	71, 113, 143	3.29
5	27.297	Fitoesteróide da Planta	-	3.68
6	28.297	Triacotino (C30H64)	57, 71,85	2.13
7	30.249	Dotriacotano (C32H66)	57, 71,85	12.02
8	32.069	Tetratriacontano (C34H70)	57, 71,85	15.64
9	32.260	2- hexacosanona	135, 146, 365	1.69
10	33.828	Hexatriacontano (C36H74)	57, 71,85	7.96
11	36.143	1-Heptacosanol	97, 125, 139	5.45

Em relação ao oferecimento dos fragmentos foliares e tricomas para colônias de *Atta sexdens rubropilosa* observou-se que as operárias carregaram preferencialmente até 60 minutos, o tratamento 2 (fragmentos foliares jovens com poucos tricomas); e os fragmentos foliares senescentes com poucos tricomas (tratamento 5) foram os menos carregados (Figura 4), esta diferença entre os dois é demonstrada estatisticamente  $F= 9.14$ ;  $p=0.016$  (Tabela 4).



**Figura 4.** Carregamento de distintos fragmentos foliares de *Virola sebifera* por operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Tratamentos: 1 – fragmentos foliares jovens; 2- fragmentos foliares jovens com poucos tricomas; 4- fragmentos foliares senescentes e 5- fragmentos foliares senescentes com poucos tricomas. Os tratamentos 3 e 6 devido a dificuldade em quantificar o carregamento não foram mensurados.

**Tabela 4.** Ordem de carregamento de fragmentos foliares de *Virola sebifera* por operárias de *Atta sexdens rubropilosa* com base no teste de Tukey ( $p=0.05$ ).

Tratamento	2a	1b	4b	5b
------------	----	----	----	----

**Legenda:** Tratamentos: 1 – discos foliares de folhas jovens; 2- discos foliares de folhas jovens com poucos tricomas; 4- discos foliares de folha senescentes e 5- discos foliares de folhas senescentes com poucos tricomas. Os tratamentos 3 e 6 devido a dificuldade em quantificar o carregamento não foram mensurados.

Para a análise de interesse das operárias pelos tricomas observou-se o comportamento das formigas para cada repetição (colônias) durante 60 minutos (Tabela 5).

**Tabela 5.** Principais respostas comportamentais de operárias de *A. sexdens rubropilosa* frente a diferentes tratamentos de *V. sebifera*.

	Primeiro Fragmento a ser explorado	Observações no decorrer dos registros (60 minutos)	Carregamento final (%) (registro em 60 minutos após o início das observações)
Colônia 1	Tratamento 3	As operárias exploraram o Tratamento 3	Tratamento 2 (100%)
Colônia 2	Tratamentos 1, 2, 3, 4 e 5	Exploraram o Tratamento 2 e evitaram o Tratamento 6	Tratamento 2 (20%) e Tratamento 4 (20%)
Colônia 3	Tratamento 4	Exploraram o Tratamento 2 que inicialmente parecia incomodar as operárias, contudo depois se habituaram	Tratamento 1 (20%), Tratamento 2 (100%) e Tratamento 4 (20%)
Colônia 4	Tratamento 4	Pouca atividade	Tratamento 2 (40%) e Tratamento 4 (20%)

**Legenda.** Tratamentos: fragmentos de folhas jovens (1), fragmentos de folhas jovens com poucos tricomas (2), tricomas presentes em folhas jovens (3), fragmentos de folha senescentes (4), fragmentos de folhas senescentes com poucos tricomas (5) e tricomas presentes em folhas senescentes (6).

Assim, na primeira repetição, o primeiro tratamento a ser explorado foi o 3 (tricomas retirados de folhas jovens; Figura 5.1b), após 15 minutos o primeiro tratamento foliar a ser carregado foi um fragmento foliar jovem com poucos tricomas (tratamento 2), sendo que as formigas continuaram explorando os tricomas coletados de folhas jovens no decorrer dos 60 minutos de observação. Registrou-se no final do experimento mais quatro fragmentos foliares carregados do tratamento 2, desta repetição. Vale ressaltar, que esta colônia mesmo após 24 horas em jejum, apresentava substratos vegetais no fungo, anteriormente ofertados para sua manutenção.

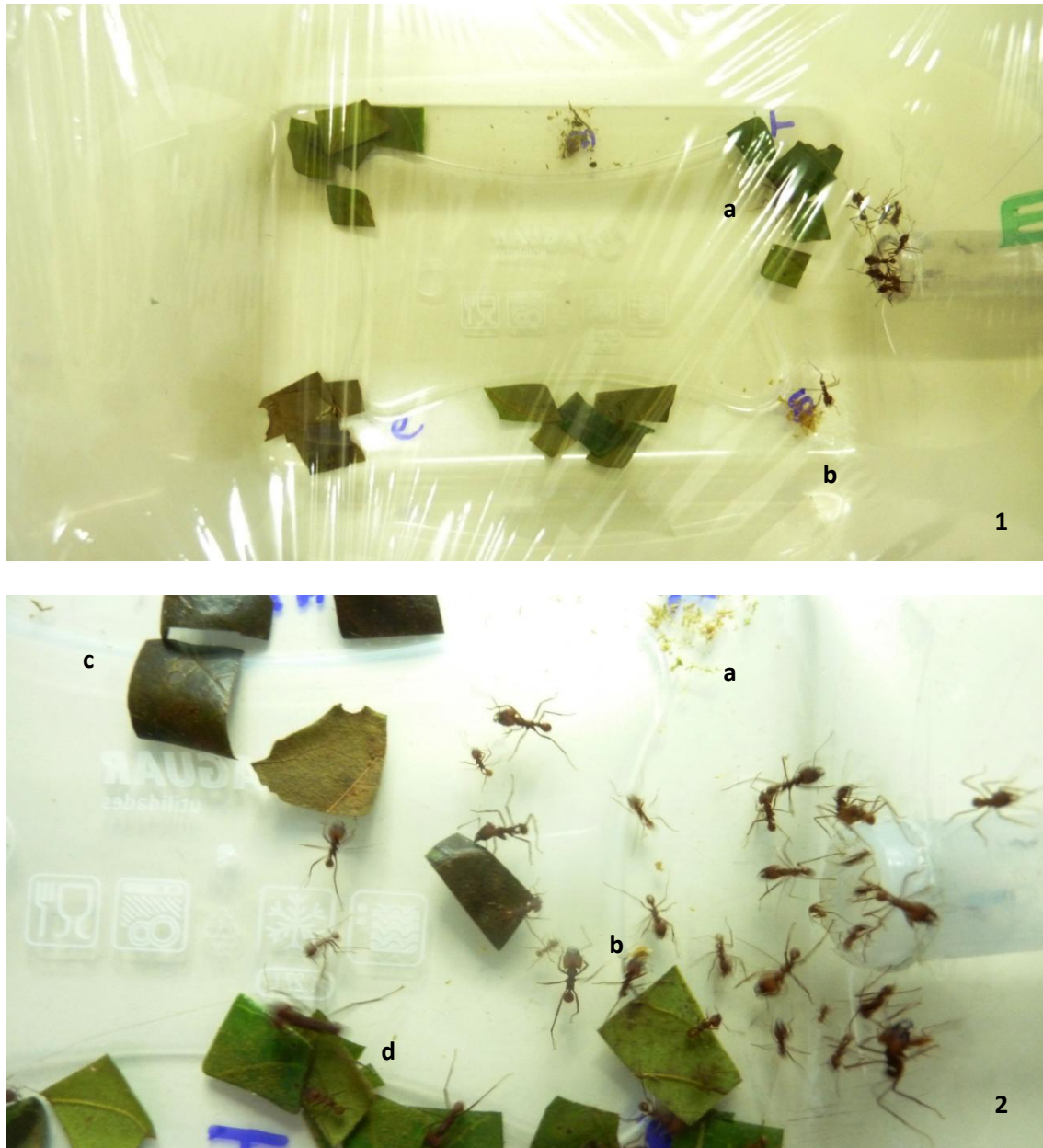
Já a colônia dois, apresentou a mesma condição que a anterior, contudo esta colônia estava mais ativa, visualmente com maior número de formigas. Inicialmente, as operárias andaram sobre os tricomas jovens, por um período de tempo e exploravam os distintos fragmentos foliares (tratamentos: 1, 2, 4 e 5) ao mesmo tempo, depois ocorreu o carregamento das folhas após 35 minutos, sendo levado o tratamento 2 primeiramente. Também, ocorreu corte de um fragmento foliar de folhas jovens, contudo foi abandonado na arena na posição de

outro tratamento (tricomas jovens). Após um minuto foi carregado um fragmento do tratamento 4 (folhas senescentes). Aqui se observou que os tricomas jovens impregnaram sobre o corpo das operárias chegando esta estrutura a ser carregada por uma delas (Figura 5.2b). Já para os tricomas de folhas senescentes elas andavam menos sobre as estruturas, no início elas evitavam e depois passavam sobre estes tricomas, só que com menos frequência quando comparado com o outro.

Para a repetição três, notou-se um grande número de formigas, outro aspecto observado foi que nesta repetição, o fungo também permaneceu com o substrato vegetal anteriormente incorporado mesmo após o tempo de jejum da colônia. Ocorreu um maior número de formigas explorando o tratamento 4 inicialmente e quando elas exploraram os tricomas no início se limpavam, porém depois pareceram se acostumar com as estruturas. Após 10 minutos, ocorreu o corte do tratamento 2 (folhas jovens senescentes com poucos tricomas), sendo que elas antenaram e lambeiram o tratamento ainda na arena de forrageamento. Uma operária após explorar o tratamento 1 e 2, optou por carregar o segundo e passados 30 minutos do oferecimento, o segundo fragmento foliar de folhas jovens com poucos tricomas foi carregado, seguido pelo tratamento 4 (fragmentos foliares de folhas senescentes). Em 38 minutos, um fragmento do tratamento 2, 48 minutos do tratamento 1 e finalmente em 55 minutos contabilizou-se mais dois fragmentos do tratamento 2.

Na quarta colônia amostrada, apesar da colônia conter visualmente muitas formigas, como as repetições 2 e 3, esta foi uma colônia que apresentou baixa atividade, após 24 horas de jejum o fungo permaneceu com incorporação nas laterais, da alimentação anterior. O tratamento 4 foi o primeiro a ser explorado pelas operárias, porém, o primeiro carregamento se deu após 40 minutos sendo o tratamento 2. Cinco minutos antes de finalizar a observação ocorreu mais um carregamento do tratamento de folhas jovens com poucos tricomas seguida por um fragmento do tratamento 4.

Portanto, nas quatro repetições as formigas exploraram mais os tricomas jovens do que os velhos, independente de qual posição os mesmos estavam dispostos na arena de forrageamento. Após 24 horas, as folhas senescentes com poucos tricomas permaneceram na arena de forrageamento, os outros fragmentos foliares foram carregados e incorporados. Havia a presença ainda de tricomas na arena de forrageamento e, devido ao pequeno tamanho das estruturas, não foi possível visualizar sua presença ou não junto ao simbionte.



**Figura 5. 1.** Vista geral - Arena de forrageamento da colônia 2: a) operária de *Atta sexdens rubropilosa* explorando fragmentos de folhas senescentes de *Virola sebifera* com tricomas (tratamento 4) e b) operária explorando tricomas de folhas jovens de *V. sebifera* (tratamento 3). **2.** Vista parcial da arena de forrageamento da colônia 3: a) tricomas de folhas jovens (tratamento 3); b) operária carregando tricomas jovens; c) fragmentos de folhas senescentes com poucos tricomas (5); d) fragmentos de folhas jovens com poucos tricomas (2).



#### 2.2.4. Discussão

O papel dos tricomas é discutido na literatura como estrutura suporte para operárias caroneiras durante o transporte das mesmas sobre o material vegetal, quando as forrageiras estão carregando este substrato contendo a operária mínima no retorno para o ninho (HASTENREITER, 2012), porém com relação à atratividade desta estrutura na seletividade das folhas existem poucos relatos.

Com este experimento, foi possível verificar que as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* preferiram carregar folhas jovens com poucos tricomas de *Viola sebifera*, e demonstraram interesse apenas por tricomas jovens quando comparados com os obtidos das folhas senescentes, além disso, os fragmentos foliares que as formigas menos carregaram, com taxa zero, foram as senescentes com poucos tricomas.

A baixa e/ou demora no carregamento dos tratamentos podem ser explicadas provavelmente, devido às condições das colônias, pois embora as mesmas tenham ficado em jejum por 24 horas, todas apresentaram o substrato incorporado no fungo simbiote fruto da alimentação anterior. Além da saturação de substratos no fungo, também se deve levar em consideração as particularidades de cada colônia, por exemplo, a repetição 3 apesar de apresentar o fungo quase saturado, foi a que apresentou maior atividade nas operárias. A repetição 4 que possuía o substrato apenas nas laterais foi a de menor atividade. Apesar das colônias utilizadas serem mantidas em condições de laboratório, a característica individual de cada uma, pode influenciar no carregamento ou não de determinada fonte vegetal, assim como em colônias de campo, elas podem variar também em sua atividade, podendo ser mais ou menos ativas.

A análise dos constituintes dos tricomas foi realizada para encontrar pistas que possam tentar explicar o porquê de tais escolhas. Os constituintes avaliados diferiram entre si, fato este que pode ter influenciado no carregamento dos tratamentos, já que no experimento anterior, quanto às ceras epicuticulares verificou-se o um composto majoritário para folhas jovens ou senescentes (Hentriacontano – C31), exceto para uma amostra em que o Nonacosano (29) foi o de maior concentração. Em relação ao carregamento das folhas, não ocorreu diferença significativa entre jovens e senescentes. Já para os tricomas de folhas jovens no presente estudo, a maior concentração obtida foi o Triacotano (C30) e para os de folhas senescentes o C34 (Tetratriacontano) foi o de maior concentração.

A biosíntese de ácidos graxos em plantas envolve um complexo sistema enzimático, cujos hidrocarbonetos são reduzidos e oxidados, resultando nos ácidos de cadeia pequena, média e longa, saturados ou insaturados. Nas análises químicas dos tricomas foi possível observar a presença destes intermediários, uma vez que foram detectados, álcoois, aldeídos e cetonas.

Os tricomas, de uma forma geral, são descritos como estruturas negativas, por liberarem exsudatos que afetam negativamente os insetos quando eles entram em contato com as plantas (KOGAN, 1976), por poder reduzir ou impedir o consumo das folhas (SCHILLINGER e GALLUM, 1968; SINGH, 1971), podem ferir fisicamente os insetos (PILLEMER e TINGEY, 1978) e secretar substâncias químicas tóxicas ou imobilizantes (LEVIN, 1973), além de que para formigas cortadeiras quando grossos dificultam o corte das folhas (OLIVEIRA, et al., 2002). Para o presente estudo, apesar das operárias terem carregado significativamente folhas jovens sem tricomas, elas exploraram e se impregnaram dos tricomas isolados das folhas, chegando a carregá-los com a mandíbula para o fungo simbionte. Talvez ocorra a ausência de repelentes nestes tricomas, pois apesar deles impregnarem no corpo das formigas que a priori parecia incomodá-las, com o tempo elas aceitaram, mas não se sabe exatamente se isso foi devido a dificuldade em retirá-los ou a ausência de compostos tóxicos não sendo essencialmente necessária a retirada dos mesmos do corpo delas.

Oliveira et al. (2002) em estudos com *Atta bisphaerica* dentre oito espécies de gramíneas e uma de leguminosa em uma análise de preferência no carregamento, não verificaram seletividade e para os pesquisadores isso provavelmente ocorreu devido a ausência de tricomas e quando presentes, sendo as estruturas bem finas. Em *Virola sebifera* estes tricomas são estruturas finas, curtas, no entanto são numerosas independentemente do estágio foliar das mesmas, são pelos estrelados e ferrugíneos.

Sugere-se que o perfil químico destes tricomas foi mais importante que sua morfologia na seletividade, pois as operárias apresentaram o corpo impregnado com os tricomas das folhas jovens, porém evitaram os tricomas coletados de folhas senescentes, portanto os constituintes químicos que variaram nas estruturas podem ter influenciado.

Além disso, as operárias carregaram preferencialmente as folhas jovens com menos tricomas, provavelmente para não sobrecarregar as formigas e/ou seu simbionte, já que nestas

estruturas foram identificados ácidos (hexadecanoico e heptadecanoico) que em excesso podem ser tóxicos principalmente para as formigas.

Para folhas senescentes, a diminuição dos tricomas nos fragmentos foliares pode ter conseqüentemente causado a baixa porcentagem de carregamento, tornando-os menos atrativos. Os tricomas coletados de folhas senescentes apresentam compostos químicos tais como: Di ocil éter, 2-hexacosanona e 1-heptacosanol que são resultados de reações com hidrocarbonetos e talvez para as operárias carregar os fragmentos foliares contendo estes constituintes foi apropriado.

### 2.2.5. Referências Bibliográficas

BIOESTAT Versão 5.3. (<http://www.mamiraua.org.br/pt-br/downloads>), 2011.

KOGAN, M. The role of chemical factors in insect/plant relationships. In: **Congress of Entomology** v.15 Washington, p.211-227, 1976.

HASTENREITER, I.N. Comportamento de caroneiras e suas implicações no forrageamento de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel 1893. Dissertação de Mestrado em Zoologia (Universidade Federal de Juiz de Fora). 2012.

LEVIN, D.A. The role of trichomes in plant defense. **Quarterly Review of Biology** v.48, p.3-15, 1973.

OLIVEIRA, C.M. et al. Espécies forrageiras preferidas por *Atta bisphaerica* FOREL 1908 (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Ceres** v.49, n.283, p321-328, 2002.

PETACCI, F. **Hidrocarbonetos cuticulares e epicuticulares de plantas relacionadas à formigas cortadeiras; Constituintes químicos de *Spathodea campanulata***. Tese de Doutorado em Química. Universidade Federal de São Carlos. 82p, 1997.

PILLEMER, E.A.; TINGEY, W.D. Hooked trichomes and resistance of *Phaseolus vulgaris* to *Empoasca fabae* (Harris). **Entomologia Experimentalis et Applicata** v.28, p.83-94, 1978.

STATISTICA 10. **StatSoft**, Inc.version 10, 2010.

SCHILLINGER, J.A.; GALLUM, R.L. Leaf pubescence of wheat as a deterrent to the cereal leaf beetle *Oulema melanopus*. **Annals of the Entomological Society of America** v.61, p900-903, 1968.

SINGH, B.B.; HADLEY, H.H.; BERNARD, R.L. Morphology of pubescence in soybeans and its relations to plant vigor. **Crop Science** v.11, p.13-16, 1971.

**PARTE III – Sinais SONOROS em *Atta* sp.**

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A maioria dos vertebrados e artrópodes é capaz de se comunicar por meio de sinais sonoros perceptíveis pelo substrato (HILL, 2009). Já se tem descrito que 150.000 espécies de insetos utilizam somente a vibração do substrato como forma de comunicação e 40.000 espécies também utilizam esta vibração, porém aliada a outra técnica para a comunicação (CROCOFT e RODRIGUES, 2005), como por exemplo, as formigas cortadeiras, que fazem uso de sinais químicos e sonoros.

Com o exoesqueleto esclerotizado, o corpo segmentado e membros articulados, inevitavelmente os insetos provocam vibrações no seu meio circundante, mas geralmente estes sons têm alguma significância especial para eles, sendo que muitos grupos possuem sistemas especializados de produção e recepção de som (HENRY, 2006). As vias de propagações do som podem ser pela água ou pelo ar, que, às vezes, podem ser audíveis aos humanos, ou podem ser propagados através do substrato onde o inseto se encontra (FERREIRA, 2005), e esta produção sonora pode ser classificada de diversas maneiras, dentre elas, segue a de Ewing (1989): vibração, percussão, estridulação, mecanismo de clique e expulsão de ar.

Resumidamente, a vibração consiste no resultado do movimento oscilatório de algumas estruturas, isto inclui as vibrações de estruturas relativamente não especializadas, oscilações do abdômen ou dorso-ventral ou lateral. Estes sons são geralmente transmitidos através das pernas para o substrato sobre o qual o inseto está caminhando (CHAPMAN, 1998). Outras partes do corpo também podem gerar vibrações, sendo a maioria, subproduto do movimento das asas, as quais geralmente são utilizadas pelos insetos para a comunicação. A oscilação dos músculos de vôo produz vibrações torácicas e das asas, em *Drosophila* (Diptera, Tephritidae), por exemplo, isto foi bem caracterizado, pelo movimento das asas, e a vibração transmitida via aérea estimulam os receptores antenares de outro indivíduo (CLARIDGE, 2006).

A percussão, ocorre com uma parte do corpo contra o outro, por exemplo, em alguns isópteros, coleópteros e plecópteros, ocorre a sinalização por percussão gerada pela ponta do abdômen com o substrato (HOWSE, 1964; STEWART e SANDBERG, 2006). Em soldados

de *Zootermopsis* (Isoptera, Termopsidae), eles utilizam a cabeça, fazendo movimentos verticais oscilatórios utilizando as pernas medianas como um fulcro, assim suas cabeças balançam para cima e para baixo, movimentando as extremidades das mandíbulas no chão e, menos freqüentemente, o topo da cabeça contra o teto de suas galerias, isto ocorre duas ou três vezes com intervalos de 50 milissegundos cada; em operários e larvas o mesmo ocorre, porém com sons de menor intensidade (CHAPMAN, 1998).

No mecanismo de clique, existe a deformação de um local da cutícula e por contração e relaxamento resulta em uma série de estalos que podem se repetir rapidamente. Um exemplo são as cigarras (Hemiptera, Cicadidae), que possuem uma estrutura denominada de timbal que gera o som. Já na expulsão de ar, é um mecanismo mais raro descrito para insetos, como para *Acherontia atropos* (Lepidoptera, Sphingidae), que emitem pulsos sonoros de curta duração produzidos por meio de uma cavidade de ar fechada por uma válvula (BUSNEL e DUMORTIER, 1959).

A estridulação se refere à produção de vibrações pela movimentação de uma crista cuticular sobre uma parte do corpo acima de uma crista denteada (KAY, 2002). Este método de produção é empregado em várias ordens de insetos, entretanto, é mais comumente encontrado em Orthoptera, Heteroptera e Coleoptera. Em formigas, a movimentação se dá pelo plectro (projeção cuticular presente no tergito do 3º segmento abdominal, ou seja, no pós-pecíolo), deslizando sobre a *pars stridens* (conjunto de estrias paralelas presente no gáster, que é o 4º segmento abdominal) (MARKL, 1968; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

Markl (1973) observou que as espécies de formigas que nidificam em solo, possuem órgão estridulador, e sugeriu que a estridulação evoluiu em Formicidae como auxílio na localização das companheiras da colônia, principalmente da rainha. Quando por ventura a colônia sofre uma perturbação, esta via de transmissão de sinal é mais efetiva do que por sinalização química no meio em que a colônia se encontra.

Segundo Ferreira (2005), as vibrações produzidas pelos insetos, na produção de som, podem ser classificadas em: (i) intra-específicas, usadas para sinalizar para outros membros da mesma espécie, ou (ii) inter-específicas, fornecendo sinais para outras espécies, sendo que as de significância intra-específica são normalmente sons organizados com uma freqüência de repetição de pulso regular e a regularidade desses padrões confere especificidade às espécies. Essas informações são codificadas como padrões temporais de pulsos e grupos de pulsos

observados por oscilogramas (Claridge, 2006). Não existe um padrão universal na nomenclatura dos sinais sonoros, isto é justificável, como já mencionado por Gerhardt e Huber (2002), pois independente do foco da pesquisa, é difícil se estabelecer uma nomenclatura padrão devido a grande diversidade estrutural dos sinais.

Geralmente para formigas, as variáveis mensuradas são as frequências, duração de *chirps* (sequência de pulso), inter-*chirps* ou intervalo, sendo o intervalo maior e as amplitudes visualizadas nele menores (KERMARREC, 1976; MARKL, 1965, 1967 e 1968; FERREIRA et al., 2010). Contudo essa denominação é bastante variável como já descrito, por exemplo, em Tettigoniidae, a sequência de pulsos é denominada de sílaba (HELLER, 2006).

A frequência de vibração sonora é o número de ciclos da mudança de pressão em relação ao tempo, que é medido em unidades de ciclos por segundo ou Hertz (Hz) no Sistema Internacional SI. A audição humana responde a frequências entre 16 Hz e 20.000 Hz, para diferentes insetos o intervalo entre os limites estão entre 15 e 120.000 Hz (ROEDER, 1965; SMITH, 1979). Em formigas as frequências são bastante variáveis, porém, não ultrapassam 2 kHz para elas se comunicarem (HICKLING e BROWN, 2000).

Várias espécies de formigas tiveram os seus padrões de estridulação analisados e caracterizados em diferentes enfoques de estudo. Entre as formigas cortadeiras estudadas estão: *Atta sexdens rubropilosa*, *A. cephalotes* e *Acromyrmex octospinosus* (KERMARREC et al., 1976; MARKL, 1965, 1967 e 1968; ROCES et al. 1993; ROCES e HÖLLDOBLER, 1995; ROCES e HÖLLDOBLER, 1996; ROCES e TAUTZ, 2001). Os sons produzidos pelas operárias possuem funções de alarme, recrutamento, escavação do ninho, forrageamento e migração (HICKLING e BROWN, 2000; RAUTH e VINSON, 2006; MENZEL e MARQUESS, 2008). Alguns tipos de parasitas sociais têm a capacidade de mimetizar os sons produzidos por formigas hospedeiras para poderem ser aceitos no interior de suas colônias (BARBERO et al., 2009).

Rauth e Vinson (2006) fizeram uma revisão dos trabalhos até então apresentados na literatura sobre a função da estridulação em formigas, nos quais, as espécies de: *Megaponera foetens* (Ponerinae) sob a perturbação individual, utilizam a estridulação como defesa e reação à respiração dos mamíferos, exibindo um comportamento agressivo como consequência (HÖLLDOBLER et al., 1994); em *Streblognathus aethiopicus* (Ponerinae), devido a perturbação individual emitem sinais sonoros para defesa reagindo à respiração de mamíferos



(WARE, 1994); *Leptogenys chinensis* (Ponerinae) a estridulação é essencial para a migração do ninho (MASCHWITZ e SCHONEGGE, 1989).

Ainda na revisão de Rauth e Vinson (2006), eles citaram outras espécies tais como: *Pogonomyrmex* spp. (Myrmicinae), em que na pós a cópula, ocorre a liberação de sinais sonoros, sendo importantes durante a fundação e escolha da rainha (MARKL et al. 1977); *Aphaenogaster* spp. (anteriormente *Novomessor*) (Myrmicinae) fazem uso da estridulação para aumentar a taxa de retirada de grandes itens alimentares enterrados, (MARKL e HÖLLDOBLER, 1978); *Messor capitatus* (Myrmicinae) aumentam a taxa de coleta de itens alimentares maiores (BARONI-URBANI, et al. 1988); em *Messor structor* (Myrmicinae) ocorre a estridulação para facilitar o recrutamento e migração do ninho (HAHN e MASCHWITZ, 1985).

Rauth e Vinson (2006) mencionaram também trabalhos com *Atta cephalotes* (Myrmicinae) na facilitação do corte de folhas, sinal para recrutamento de operárias caroneiras e de escavação (RAUTH e VINSON, 2006; MARKL, 1967; ROCES et al., 1993; ROCES e HÖLLDOBLER 1995 e 1996; TAUZ et al., 1995). Mas vale ressaltar que Hölldobler e Rocés (2001), verificaram que a estridulação não facilita o corte das folhas, trabalho este não citado na revisão.

Além disso, as espécies *Acromyrmex octospinosus* e *Atta sexdens* também tiveram os sinais sonoros estudados; para a primeira caracterizou a morfologia do órgão estridulador para as distintas castas e a frequência de estridulação das mesmas, e para a segunda foi verificado que quando as folhas são atrativas ocorre um recrutamento a curtas distâncias de mais operárias para a fonte (KERMARREC et al., 1976 e ROCES et al. 1993).

Nos estudos com *Solenopsis invicta*, Rauth e Vinson (2006), observaram a estridulação da colônia frente à migração, perturbação e escavação. No momento da escavação a estridulação teve um aumento significativo quando comparado aos outros comportamentos estudados.

Barbero et al. (2009) em estudos com *Myrmica schencki*, observaram que um parasita, *Maculinea rebeli* (Lepidoptera, Lycaenidae), no final do estágio larval, cai no solo, mimetiza um hidrocarboneto semelhante ao da formiga, é carregado por ela e permanece na colônia de 11 a 23 meses. Durante este tempo, o lepidóptero é alimentado pelas operárias e o fato interessante observado, é que esta larva produz um som semelhante ao da rainha, sendo que as larvas desta formiga não produzem som algum.

Ferreira et al. (2010), utilizaram a ferramenta de estridulação para caracterizar um complexo de *Pachycondyla* e verificaram que os sinais sonoros diferem para espécies simpátricas, assim, juntamente com diferenças morfológicas e genéticas caracterizaram *Pachycondyla apicalis* em um complexo de no mínimo seis espécies.

Para as formigas pertencentes a tribo Attini, são encontrados trabalhos apenas com cortadeiras. Markl (1965) foi o primeiro a estudar os sinais sonoros para *Atta cephalotes*, ao impedir os soldados de transitarem ocorre a estridulação, como um sinal de alarme. Em outro trabalho, com *Acromyrmex octospinosus* e *A. cephalotes* foi verificado que as formigas sempre estridulam quando estão presas. Em *A. cephalotes* ocorre atração de operárias da mesma espécie por meio do substrato, em até 8 cm de distância; quando a formiga é enterrada outras vão em socorro, porém se estiver no máximo a 5 cm, para atrair outras com a vibração, no entanto, apenas estridulações em que os indivíduos atraídos estão a 3cm que dispara o comportamento de desenterrar a operária. Com isso, pode-se afirmar que a estridulação é um sistema de alarme bastante importante para a vida colonial (MARKL, 1967).

Em 1968, Markl, mensurou as estrias presentes na *pars stridens* do órgão estridulador de *Atta cephalotes* e *Acromyrmex octospinosus*, além de caracterizar os sinais acústicos da espécie de saúva estudada em uma faixa de tamanho específica para operárias. Nos trabalhos de Roces e Hölldobler (1995), os autores observaram que a forrageira ao ajeitar a folha para carregar, aumenta a estridulação; a estridulação atrai operárias mínimas que permanecem mais tempo nas folhas e o número de operárias mínimas nas folhas carregadas pelas forrageiras são maiores na presença do sinal sonoro.

Para formigas existe uma contradição de como elas transmitem as vibrações. Alguns pesquisadores defendem que as formigas transmitem o som via substrato, ou seja, a estridulação produzida pelo órgão estridulador, passa por meio das pernas do inseto para o substrato, e eles captam a vibração do meio pelas pernas e pêlos adaptados (MARKL, 1965; MASTER et al., 1983; ROCES e TAUTZ, 2001); outros defendem que esta vibração é captada com o auxílio das antenas, sendo portanto o som transmitido via aérea e captado pelas sensilas tricóides (HICKLING e BROWN, 2000; HICKLING e BROWN, 2001) e questionam a via substrato, pois os insetos que fazem uso deste meio de transmissão batem no mesmo para produzir o sinal.

Devido ainda a escassez de trabalhos tanto com cortadeiras, ou mesmo com a tribo Attini em que elas estão inseridas, o presente trabalho estudou a estridulação sobre vários contextos, comparando: (i) espécies intermediárias, *Trachymyrmex tucumanus* e *T. fuscus*,

com uma derivada, *Atta sexdens rubropilosa*; (ii) as fêmeas não fecundadas das espécies de *Atta* que ocorrem no estado de São Paulo (*Atta sexdens rubropilosa*, *Atta capiguara*, *Atta bisphaerica*, *Atta laevigata*), (iii) castas da formiga cortadeira *A. sexdens rubropilosa* quando submetidas a estresse e (iv) a vibração produzida durante o processamento e incorporação do substrato, utilizando *A. laevigata* como modelo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBERO, F. et al. Acoustical mimicry in a predatory social parasite. **The Journal of Experimental Biology** v.212, p.4084-4090, 2009.
- BARONI-URBANI, C.; BUSER, M.W.; SCHILLIGER, E. Substrate vibration during recruitment in ant social organization. **Insectes Sociaux**, v.3, n.3, p. 251-250,1988.
- BUSNEL, R. G.; DUMORTIER, B. Vérification par les methods d'analyse acoustique des hypothèses sur l'origine du cri du Sphinx, *Acherontia atropos* (Linné). **Bulletin de la Société entomologique de France** v.64. p.44–58, 1959.
- CHAPMAN, R.F. **The insect structure and function**. Cambridge, The English Universities Press, 4nd ed., 798p., 1998.
- CLARIDGE, M. Part I. General aspects of insect sounds: Insect sounds and communication – And introduction. In: **Insect sounds and communication: physiology, behavior, ecology and evolution** p.1-9, 2006.
- COCROFT, R. B.; RODRÍGUEZ, R. L. The behavioral ecology of vibrational communication in insects, **BioScience** v.55, p.323–334, 2005.
- EWING, A. W. **Arthropod Bioacoustics: Neurobiology and Behaviour**, Edinburgh University Press,Edinburgh, 260p., 1989.
- FERREIRA, R. et al. Stridulation Reveal Cryptic Speciation in Neotropical Sympatric Ants. **Plos ONE** v.5, n.12 p.1-11, 2010.
- FERREIRA, R.S. **A produção de sons pelos insetos e seus significados**. Monografia apresentada à disciplina de Fisiologia de Insetos. Universidade Federal de Lavras, Departamento de Entomologia: 32p., 2005.
- GERHARDT, H. C. ; HUBER, F.. **Acoustic Communication in Insects and Anurans. Common Problems and Diverse Solutions**. University of Chicago Press, Chicago, IL. 2002.

- HAHN M, MASCHWITZ U. Foraging strategies and recruitment behaviour in the European harvester ant *Messor rufitarsis* (F.) **Oecologia** V. 68, p. 45-51, 1985.
- HENRY, C.S. Acoustic Communication in Neuropterid Insects In: Insect sounds and communication. **Physiology, behavior, ecology and evolution** p.153-166, 2006.
- HELLER, K. G. Song evolution and speciation in bushcrickets. In: **Insect sounds and communication: physiology, behavior, ecology and evolution** p.137-152, 2006.
- HICKLING, R.; BROWN, R.L. Analysis of acoustic communication by ants. **Journal of the Acoustics Society of America**. v.108, p.1920-1929, 2000.
- HICKLING, R.; BROWN, R.L. Response to “Ants are deaf”. **Journal of the Acoustical Society of America** v.109, n.6, p.3083, 2001.
- HILL, P.S.M. How do animals use substrate-borne vibrations as an information source? **Naturwissenschaften**, v.96, p.1355–1371, 2009.
- HÖLLDOBLER, B.; ROCES, F The behavioral ecology of stridulatory communication in leaf-cutting ants. **Model systems in behavioral ecology – Integrating conceptual, theoretical and empirical approaches**. ed. By L.A. Dugatkin, Princeton, Princeton University Press, p. 92-109, 2001.
- HÖLLDOBLER, B. et al. Trail communication in the ant *Megaponera foetens* (Fabr.) (Formicidae, Ponerinae). **Journal Insect Physiology** v.40,p.585–593, 1994.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press. p.133-154, 1990.
- HOWSE, P. E.. The significance of sound produced by the termite *Zootermopsis angusticollis* (Hagen), **Animal Behaviour** v.12, p.284–300, 1964.
- KAY. A. Acoustics of friction. **Journal of the Acoustical Society of America**, v.111, n.4, p.1525-1548, 2002.
- KERMARREC, A.; MAULEON, H.; ANTUN, A.A. La stridulation de *Acromyrmex octospinosus* Reich. (Hymenoptera: Formicidae): Biométrie de l'appareil stridulateur et analyse du signal produit. **Insectes Sociaux**. v.23, p.29-48, 1976.

- MARKL, H. The evolution of stridulatory communication in ants. In **Proceedings of the VII Congress IUSI**, London, pp. 258–265, 1973.
- MARKL, H; HÖLLDOBLER, B; HÖLLDOBLER, T. Mating behavior and sound production in harvester ant (*Pogonomyrmex*, Formicidae). **Insectes Sociaux** Tome 24, n.2, p.191-212, 1977.
- MARKL, H; HÖLLDOBLER, B. Recruitment and Food-Retrieving Behavior in *Novomessor* (Formicidae, Hymenoptera) II. Vibration Signals\*. **Behavioral Ecology and Sociobiology** v.4, 183-216, 1978.
- MARKL H. Die Verständigung durch Stridulationssignale bei Blattschneiderameisen II. Erzeugung und Eigenschaften der Signale. **Zeitschrift für vergleichende Physiologie** v.69, p.6-37, 1968.
- MARKL, H. Die Verständigung durch Stridulationssignale bei Blattschneiderameisen I. Die biologische Bedeutung der Stridulation. **Zeitschrift für vergleichende Physiologie** v.57, p.299-330, 1967.
- MARKL, H. Stridulation in leaf cutting ants. **Science**. v.149, p.1392-1393, 1965.
- MASCHWITZ, U.; SCHONEGGE, P Forage communication, nest moving recruitment, and prey specialization in the oriental ponerine *Leptogenys chinensis*. **Oecologia** v.57, p.175–182, 1989.
- MASTERS, W. M. et al. Body Vibration and Sound Production in an Insect (*Atta sexdens*) without Specialized Radiating Structures, **Journal of Comparative Physiology** v.150, p.239-249, 1983
- MENZEL, T.O.; MARQUESS, J.R. The substrate vibration generation behavior of *Aphenogaster carolinensis* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Insect Behavior** v.21, p.82-88, 2008.
- RAUTH, S.J.; VINSON, S.B. Colony wide behavioral contexts of stridulation in imported fire ants (*Solenopsis invicta* Buren). **Journal of Insect Behavior**. v.19, p.293-304, 2006.
- ROCES, F.; TAUTZ, J. Ants are deaf. **Journal of the Acoustical Society of America** v.109, p.3080-3082, 2001.

- ROCES, F.; HÖLLDOBLER, B. Use of stridulation in foraging leaf cutting ants: mechanical support during cutting or short-range recruitment signal? **Behavioral Ecology and Sociobiology** v.39, p.293-299, 1996.
- ROCES, F.; HÖLLDOBLER, B. Vibrational communication between hitchhikers and foragers in leaf cutting ants (*Atta cephalotes*). **Behavioral Ecology and Sociobiology** v.37, p.297-302, 1995.
- ROCES, F.; TAUTZ, J.; HÖLLDOBLER, B. Stridulation in leaf cutting ants: short-range recruitment through plant borne vibrations. **Naturwissenschaften** v.80, p.521-524, 1993.
- ROEDER, K. Moths and ultrasound. **Scientific American** v.232, p.94–102, 1965.
- SMITH, W. J. The study of ultrasonic communication, **American Zoologist** v.19, p.531–538, 1979.
- STEWART, K. W.; SANDBERG J. B. Vibratory Communication and Mate Searching Behaviour in Stoneflies. In: **Insect sounds and communication: physiology, behavior, ecology and evolution** p.179-186, 2006.
- TAUTZ, J.; ROCES, F.; HÖLLDOBLER, B. Use of a sound based vibratome by leaf cutting ants. **Science**. 267: 84-87, 1995.
- WARE, A. B. Factors eliciting stridulation by the ponerine ant *Streblognathus aethiopicus* Smith (Hymenoptera, Formicidae). **African Entomology** v.2, p.31–36, 1994.

### 3.1. Bioacústica de *Trachymyrmex fuscus*, *Trachymyrmex tucumanus* e *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae).

#### Resumo

A capacidade de produzir som por estridulação ocorre por meio do atrito entre o plectro e as estrias da *pars stridens* durante a flexão do gáster e é bastante comum entre as formigas, sendo utilizado para a identificação de espécies. Dentre as formigas cultivadoras de fungo, inseridas na tribo Attini, as espécies do gênero *Trachymyrmex* estão em uma posição filogenética intermediária entre as cortadeiras, como *Atta sexdens rubropilosa* e as espécies basais, e seu estudo é muito importante para o entendimento da evolução dos diversos aspectos biológicos da tribo. Desta forma, o objetivo deste presente trabalho foi analisar o sinal de estridulação produzido por operárias de *Trachymyrmex fuscus*, *Trachymyrmex tucumanus* e *Atta sexdens rubropilosa*. As formigas foram submetidas a estresse e tiveram os registros da vibração realizados no órgão estridulador das mesmas. Foram analisados os seguintes parâmetros: *chirps* (conjunto de pulsos), intervalo entre *chirps*, ciclos (*chirps* + intervalo), taxa de repetição dos ciclos/segundos e a frequência principal, além de analisar o número de estrias da *pars stridens* envolvidas no processo. Nos oscilogramas, nota-se que a amplitude do sinal para *A. sexdens rubropilosa* durante o intervalo entre *chirps* é mais baixa quando comparada com as Attini intermediárias, permitindo inferir que para esta espécie o contato é pouco ou quase nulo com as *pars stridens*. A duração dos ciclos foi maior para *T. tucumanus* ( $200.61 \pm 26.70$ ), porém a duração do intervalo entre *chirps* foi maior para *A. sexdens rubropilosa* ( $110.12 \pm 25.12$ ). Por meio da Análise dos Componentes Principais verificou-se que a estridulação foi uma ferramenta eficiente para a separação das espécies, sendo a duração de *chirps* a componente que mais contribuiu.

**Palavras chave:** formigas cortadeiras, estridulação.



### 3.1.1. Introdução

Nas espécies da tribo Attini (formigas cultivadoras de fungo), o comportamento de estridulação e sua função no forrageio e no recrutamento das operárias foram estudados em formigas cortadeiras do gênero *Atta* (ROCES et al., 1993; TAUTZ et al., 1995; ROCES e HÖLLDOBLER, 1995; ROCES e HÖLLDOBLER, 1996), sendo o som produzido por operárias caracterizado e analisado em apenas duas espécies: *Atta cephalotes* e *Acromyrmex octospinosus*, todas cortadeiras (MARKL, 1965; KERMARREC et al., 1976).

Já se sabe que os comportamentos desencadeados por sinais sonoros em *Atta* são os que mediam respostas a curtas distâncias (ROCES e HÖLLDOBLER, 1996). Existe uma controvérsia na literatura como esses sinais são transmitidos, via aérea ou via substrato (MARKL, 1965; MASTER et al., 1983; HICKLING e BROWN, 2000; ROCES e TAUTZ, 2001; HICKLING e BROWN, 2001), tendo suporte as duas hipóteses. Contudo, este estudo apenas será de caracterização de espécies, pois a maior parte das espécies da tribo Attini foi pouco estudada e nenhuma espécie dos outros gêneros, inseridos nela, teve a estridulação analisada, apesar do seu estudo ser importante para a melhor compreensão da evolução dos padrões biológicos observados nas cortadeiras.

O gênero *Trachymyrmex* está em uma posição importante na filogenia da tribo, entre as formigas cortadeiras e as Attini basais. Possui aproximadamente 42 espécies que ocorrem principalmente na região Neotropical e se caracterizam por possuírem operárias monomórficas que forrageiam de forma solitária e utilizam principalmente material vegetal em decomposição para o cultivo do fungo simbiote. Suas colônias possuem poucas câmaras a pequenas profundidades, com pequenas a médias populações. Suas características comportamentais, biológicas e de arquitetura de ninhos são consideradas intermediárias entre estes dois grupos, Attini derivadas e basais (WEBER, 1966; SCHULTZ E BRADY, 2008; MAYHE-NUNES e BRANDÃO, 2002; DINIZ e BUENO, 2010).

Desta forma, a melhor caracterização dos vários aspectos biológicos de *Trachymyrmex*, inclusive o seu padrão de estridulação, são muito importantes para se compreender a transição da organização social das Attini basais para a das formigas cortadeiras. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar os sinais sonoros, produzidos por estridulação de operárias de *Trachymyrmex fuscus*, *Trachymyrmex tucumanus* e *Atta sexdens rubropilosa* fornecendo subsídios para uma comparação dentro desta tribo.

### 3.1.2. Material e Métodos

O experimento foi realizado no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro. Para tal utilizou-se operárias de duas colônias diferentes: 17 operárias de *Trachymyrmex fuscus* (10 operárias da colônia 1 e 7 da colônia 2), 19 de *Trachymyrmex tucumanus* (10 e 9) e 11 de *Atta sexdens rubropilosa* (6 e 4), sendo amostradas três repetições das estridulações de cada indivíduo. As operárias das três espécies foram coletadas no *Campus* da UNESP de Rio Claro SP.

Para a análise do som produzido pelas operárias foi utilizado um vibrômetro laser (PDV 100, Polytec). O laser foi apontado para a região dorsal entre o terceiro e o quarto segmentos abdominais, onde se localiza o órgão estridulador. As vibrações captadas pelo vibrômetro foram armazenadas em computador por meio do software Vibsoft 4.7 (Polytec). O oscilograma do padrão temporal foi transformado através de uma FFT e assim determinada a sua frequência principal.

Antes de registrar as vibrações, cada operária foi imobilizada em massa de modelar, fixada na região da cabeça, submetendo-as assim a estresse para que começassem a estridular. As vibrações foram registradas no intervalo de 0 a 1000 Hz e foram realizadas as medidas para *Trachymyrmex fuscus* e *T. tucumanus*, e 0 a 1400 Hz para *A. sexdens rubropilosa* valores padronizados por testes prévios.

Esses sinais sonoros produzidos pelas operárias foram registrados em três períodos consecutivos de 12,8 segundos cada, totalizando 38,4 segundos de análise para cada operária. Os parâmetros temporais avaliados foram: *chirps*\* (conjunto ou sequência de pulsos), *inter-chirps* (intervalo entre *chirps*), *ciclos* (*chirps* + intervalo), taxa de repetição dos ciclos/segundos e frequência principal. Além disso, verificou-se o número de estrias envolvidas no processo da produção da estridulação, ou seja, a média do número de pulsos gerados por uma *chirps* para cada espécie, conforme metodologia descrita por Ferreira et al. (2010).

Os dados foram convertidos em arquivos de som (wav) e analisados pelo software Raven Pro Version 1.4 e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, em seguida foram realizadas as seguintes análises: Componentes Principais (Programa PAST: HAMMER, et al. 2001).

\* *Chirps*: é um sinal em que ocorre o aumento da frequência ("up-chirp") ou diminuição ("down-chirp") em um dado tempo.

### 3.1.3. Resultados e Discussão

A estridulação produzida por operárias das três espécies estudadas segue de uma maneira geral o padrão observado para outras formigas e outros insetos. Ela ocorre em uma sequência de pulsos repetidos a intervalos constantes (Figuras 1, 2 e 3). HELLER, K.G. (2006) definiu para Tettigoniidae, como sílaba o movimento de abertura e fechamento de asas, para o presente estudo definiu-se esse termo como ciclo (*chirps* + intervalo) em que ocorre o levantamento e o abaixamento do gáster das formigas.

Um *chirp* é composto por impulsos que se tornam de uma maneira geral menor em amplitude ao longo da duração, como por exemplo, demonstrado na Figura 1C de *Trachymyrmex fuscus* e 2C para *T. tucumanus*. Já para *Atta sexdens rubropilosa* ao longo da duração de *chirp*, os pulsos se mantêm na maioria constantes na magnitude, porém apresentam baixa amplitude no início e no final da sequência de pulsos, diferindo, portanto, do padrão das espécies intermediárias (Figura 3C). As três espécies, no intervalo, possuem magnitude menores, ou seja, como já descrito por Hölldobler e Wilson (1990), é devido ao plectro perder parcialmente o contato com a *pars stridens*, porém, vale ressaltar que ao analisar os oscilogramas nota-se que a amplitude do sinal para *A. sexdens rubropilosa* é mais baixa quando comparada com as Attini intermediárias, permitindo inferir que o contato é pouco ou quase nulo com as *pars stridens* durante o intervalo, isto já havia sido observado para soldados de *Atta cephalotes* por Markl (1968).

As médias de duração de *chirps*, intervalos entre dois *chirps* e os ciclos de estridulação estão descritos nas Figuras 1 a 3. Essa configuração ocorre, pois após o movimento dos tergitos 3° e 4° durante a estridulação, eles ficam parados em poucos milissegundos, durante a mudança do movimento que gera os *chirps* e o que gera o intervalo. Por este mecanismo, se explica o fato da duração do intervalo entre dois *chirps* terem sido ligeiramente maior que a duração dos *chirps*, isto também é semelhante ao que já foi descrito para outras espécies de formigas e outros insetos. Contudo, a média da colônia 1 de *Trachymyrmex tucumanus*, possui o intervalo ligeiramente menor, entretanto a média geral que caracterizou a espécie seguiu o mesmo padrão (Tabela 1 e Figura 2).

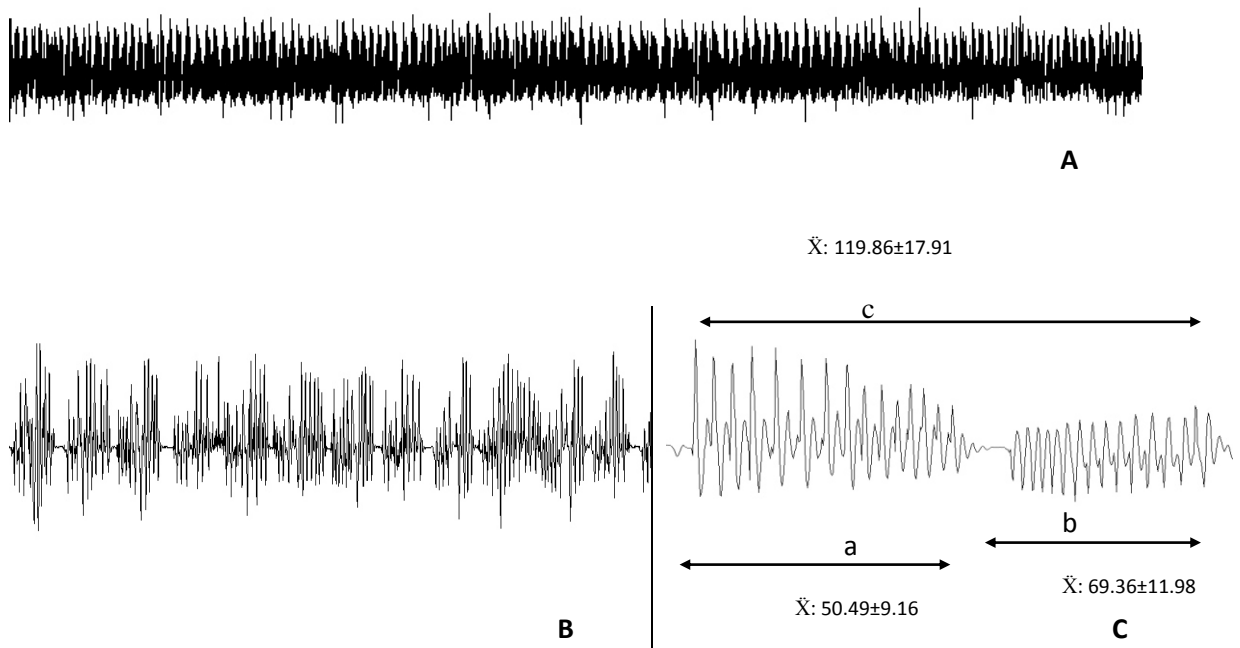
O movimento de raspagem do plectro sob cada estria da *pars stridens* gera um pulso, como caracterizado por Ferreira et al. (2010), no qual os pesquisadores contaram quantas estrias estavam envolvidas no movimento, ou seja, a média de pulsos para cada *chirp* ao estudar um complexo de espécies de *Pachycondila* e verificaram que dependendo da espécie

pode variar de 77.68 a 121.59. No presente estudo, não se realizou a microscopia eletrônica das operárias, portanto, não foram descritas quantas estrias estão presentes no órgão estridulador, mas, observou-se o número de estrias envolvidas na estridulação. Em *Trachymyrmex tucumanus* a média de estrias envolvidas durante o *chirp* foram de  $20.09 \pm 3.9$ , em *T. fuscus* foi de  $10.53 \pm 2.82$  e em *Atta sexdens rubropilosa*,  $19,33 \pm 5,03$ . Ao se verificar a duração de *chirps*, nota-se que quanto maior o número de estrias, maior foi a duração de *chirps*. A média da taxa de repetição dos ciclos descrita foi para *T. tucumanus*:  $5.07 \pm 0.71$  ciclos/segundos; *T. fuscus*:  $8.48 \pm 1.32$  e *A. sexdens rubropilosa*  $5.96 \pm 1.11$  (Figuras 1 a 3).

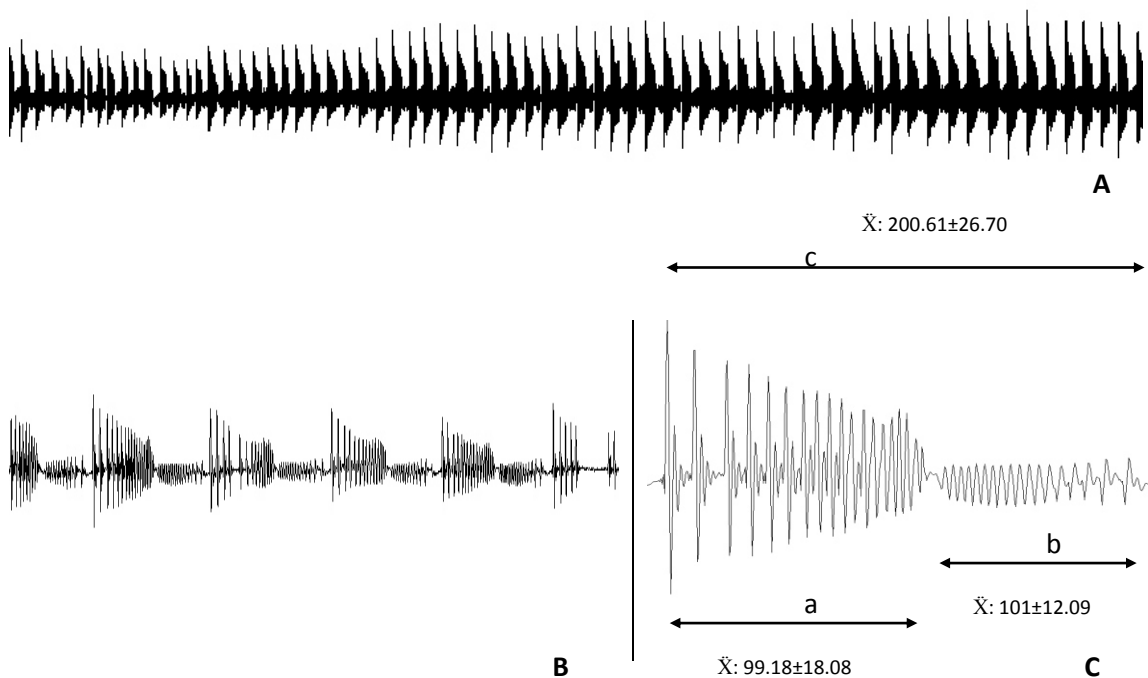
Com relação à média da frequência principal de estridulação foi de  $306.00 \pm 33.72$  Hz para *T. tucumanus*,  $183.40 \pm 42.44$  Hz em *T. fuscus* e  $320.59 \pm 138.50$  Hz para *A. sexdens rubropilosa*. Em *Messor*, a faixa de estridulação destes insetos é de 41 à 98 Hz (GRASSO et al. 2000), já Ferreira et al. (2010) para o complexo de espécies de *Pachycondila*, verificaram que as mesmas estridulam de 605.27 a 856.87 Hz, sendo ambos os grupos bem distintos da tribo Attini.

**Tabela 1.** Média e desvio padrão das estridulações registradas: duração de *chirps*, intervalo e ciclos para as operárias e colônias registradas em três espécies amostradas: *Trachymyrmex fuscus*, *Trachymyrmex tucumanus* e *Atta sexdens rubropilosa*; sendo duas colônias cada.

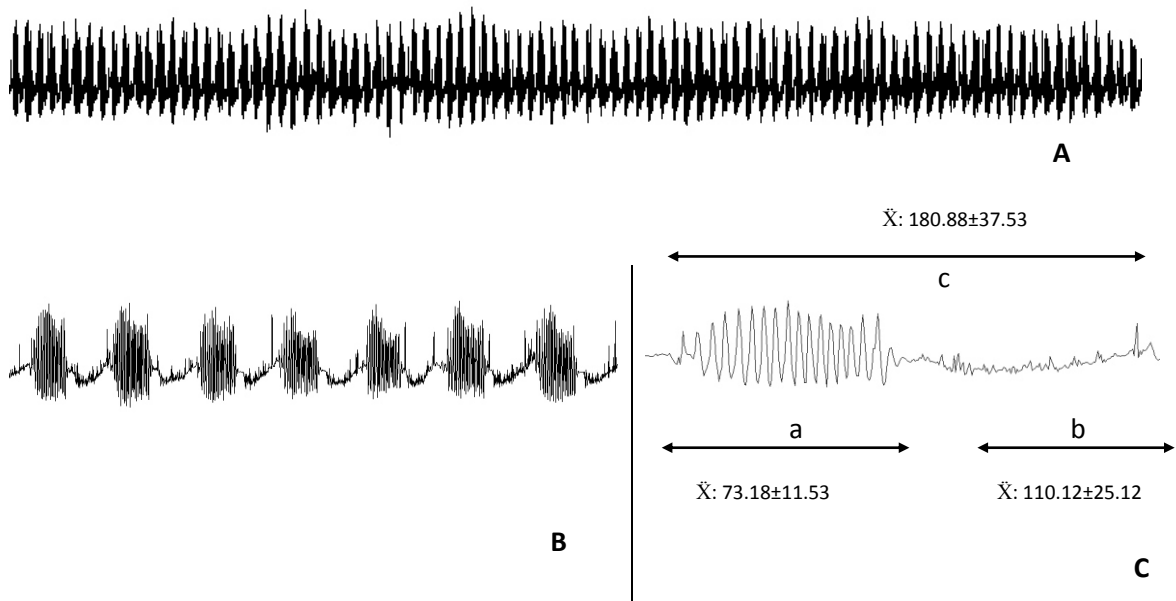
Espécie	<i>Chirps</i> (ms)	Intervalo entre <i>chirps</i> (ms)	Ciclos (ms)
<i>T. fuscus</i> – Colônia 1	50.42 +/-6.75	63.25 +/-13.15	124.20+/-18,19
<i>T. fuscus</i> – Colônia 2	50.55 +/-10.91	73.65 +/-9.51	124.20 +/-18.2
<i>T. tucumanus</i> – Colônia 1	103.84+/-22.18	100.56+/-12.6	202.75+/-30.86
<i>T. tucumanus</i> – Colônia 2	96.00+/-12.81	102.42+/-11.13	198.47+/-19.15
<i>A sexdens rubropilosa</i> – Colônia 1	78.89+/-17.85	133.06+/-26.65	211.96+/-43.79
<i>A sexdens rubropilosa</i> – Colônia 2	69.38+/-2.19	94.82+/-2.80	166.33+/-10.30



**Figura 1.** Oscilograma de um sinal acústico produzido por uma operária de *Trachymyrmex fuscus*. A – O sinal registrado em 12.8s. B – 1 segundo de um sinal demonstrando os ciclos. C - detalhe de um ciclo: a – *chirps*; b – intervalo; c – 1 ciclo.

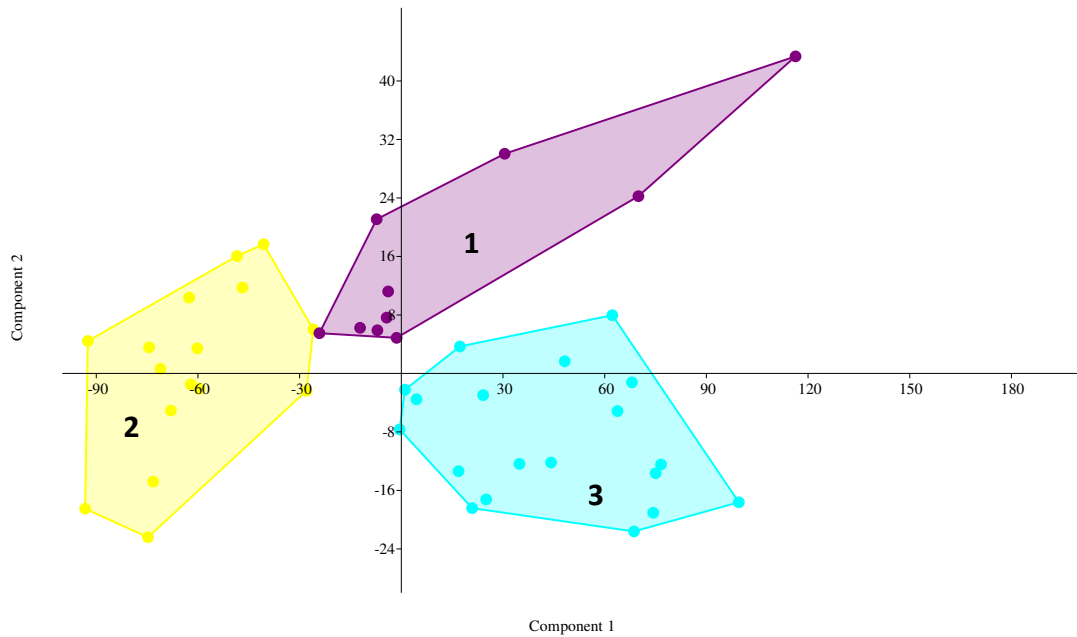


**Figura 2.** Oscilograma de um sinal acústico produzido por uma operária de *Trachymyrmex tucumanus*. A – O sinal registrado em 12.8s. B – 1 segundo de um sinal demonstrando os ciclos. C - detalhe de um ciclo: a – *chirps*; b – intervalo; c – 1 ciclo.



**Figura 3.** Oscilograma de um sinal acústico produzido por uma operária de *A. sexdens rubropilosa*. A – O sinal registrado em 12.8s. B – 1 segundo de um sinal demonstrando os ciclos. C - detalhe de um ciclo: a – *chirps*; b – intervalo; c – 1 ciclo.

A configuração descrita como padrão acústico, portanto, é devido ao movimento dos tergitos 3 e 4, por isso, por meio da análise dos componentes principais, utilizou-se apenas os seguintes parâmetros: duração de *chirps* e do intervalo. Ocorreu o agrupamento das espécies, diferindo-as, sendo que o componente 1, duração de *chirps*, contribuiu com 94.11% e o componente 2, duração do intervalo entre duas *chirps*, foi com 5.41% (Figura 4). Estudos que descrevam os comportamentos mediados por estes sinais sonoros para cada espécie devem ser realizados e poderão esclarecer mais aspectos evolutivos da tribo Attini.



**Figura4.** Análise dos componentes principais. Legenda: *Atta sexdens rubropilosa* (1); *Trachymyrmex fuscus* (2); *Trachymyrmex tucumanus*. (3).

Portanto, o presente trabalho demonstrou que as análises dos sinais acústicos foram eficientes para diferenciar duas espécies intermediárias de uma derivada na tribo Attini. E dentre as duas espécies de *Trachymyrmex* foi possível separá-las fazendo uso desta ferramenta (Análise dos Componentes Principais). Para esclarecer mais aspectos evolutivos da tribo Attini, sugere-se que devem ser realizados estudos que descrevam os comportamentos mediados por estes sinais sonoros para as espécies estudadas.

### 3.1.4. Referências Bibliográficas

- DINIZ, E.A.; BUENO, O.C. Evolution of substrate preparation behaviors for cultivation of symbiotic fungus in Attine ants. **Journal of Insect Behavior** v.23, p.196-205, 2010.
- FERREIRA, R. et al. Stridulation Reveal Cryptic Speciation in Neotropical Sympatric Ants. **Plos ONE** v.5, n.12 p.1-11, 2010.
- GRASSO, D. A. et al. Stridulation in four species of *Messor* ants (Hymenoptera, Formicidae). **Italian Journal of Zoology** 67:281-283, 2000.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T. ; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** v4, n.1, 9 p., 2001. (Programa **PAST**)
- HELLER, K. G. Song evolution and speciation in bushcrickets. In: **Insect sounds and communication: physiology, behavior, ecology and evolution** p.137-152, 2006.
- HICKLING, R.; BROWN, R.L. Analysis of acoustic communication by ants. **Journal of the Acoustics Society of America**. v.108, p.1920-1929, 2000.
- HICKLING, R.; BROWN, R.L. Response to “Ants are deaf”. **Journal of the Acoustical Society of America** v.109, n.6, p.3083, 2001.
- HÖLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press. p.133-154, 1990.
- KERMARREC, A.; MAULEON, H.; ANTUN, A.A. La stridulation de *Acromyrmex octospinosus* Reich. (Hymenoptera: Formicidae): Biométrie de l'appareil stridulateur et analyse du signal produit. **Insectes Sociaux** v.23, p.29-48, 1976.
- MAYHE-NUNES, A.J.; BRANDÃO, R.F. Revisionary studies on the Attine ant genus *Trachymyrmex* Forel Part 1: Definition of the genus and the opulentus group (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology** v.40, n.3, p.667-668, 2002.
- MASTERS, W. M. et al. Body Vibration and Sound Production in an Insect (*Atta sexdens*) without Specialized Radiating Structures, **Journal of Comparative Physiology** v.150, p.239-249, 1983.



- MARKL, H. Stridulation in leaf cutting ants. **Science**. v.149, p.1392-1393, 1965.
- MARKL, H. Die Verständigung durch Stridulationssignale bei Blattschneiderameisen II. Erzeugung und Eigenschaften der Signale. **Zeitschrift für vergleichende Physiologie** v.69. p.6-37, 1968.
- RAVEN PRO. Version 1.4. Bioacoustics Research Program. **Raven Pro: Interaction Sound Analysis software** (Version 1.4) (Computer Software). Ithaca, NY: The Cornell Lab. Of Ornithology. [http:// www.birds.cornell.edu/raven](http://www.birds.cornell.edu/raven), 2011.
- ROCES, F.; TAUTZ, J. Ants are deaf. **Journal of the Acoustical Society of America** v.109, p.3080-3082, 2001.
- ROCES, F.; HÖLLDOBLER, B. Use of stridulation in foraging leaf cutting ants: mechanical support during cutting or short-range recruitment signal? **Behavioral Ecology and Sociobiology** v.39, p.293-299, 1996.
- ROCES, F.; HÖLLDOBLER, B. Vibrational communication between hitchhikers and foragers in leaf cutting ants (*Atta cephalotes*). **Behavioral Ecology and Sociobiology** v.37, p.297-302, 1995.
- ROCES, F.; TAUTZ, J.; HÖLLDOBLER, B. Stridulation in leaf cutting ants: short-range recruitment through plant borne vibrations. **Naturwissenschaften** v.80, p.521-524, 1993.
- SCHULTZ, T.R., BRADY, S.G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **PNAS** v.105,p.5435-5440, 2008.
- TAUTZ, J.; ROCES, F.; HÖLLDOBLER, B. Use of a sound based vibratome by leaf cutting ants. **Science**. 267: 84-87, 1995.
- VIBSOFT 4.7. **Polytec Vibrometer Software**, Polytec GmbH, Waldbronn, 1997-2009.
- WEBER, N.A. Fungus growing ants. **Science**. v.153, p.587-604, 1966.

### 3.2. Padrão sonoro de fêmeas não fecundadas de *Atta laevigata*, *Atta capiguara*, *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae).

#### Resumo

Em *Atta* spp já se sabe que a estridulação é reconhecidamente importante no corte das folhas, construção dos ninhos, atração para o forrageio e transmissão de informações sobre a presença de inimigos. Contudo, nenhum estudo enfatizou este perfil sonoro para a caracterização das espécies do gênero. Assim, o presente estudo teve como objetivo diferenciar quatro espécies de *Atta*, economicamente importantes no Brasil, por meio do perfil de estridulação de cada uma delas. Para isso, foram submetidas a estresse dez fêmeas não fecundadas de dois ninhos (5 fêmeas de cada ninho) para cada espécie: *Atta laevigata*, *Atta capiguara*, *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica*. O registro sonoro foi realizado no órgão estridulador destas fêmeas durante o estresse das mesmas. Além disso, o órgão estridulador das fêmeas foi analisado por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura, com o intuito de contabilizar as estrias da *pars stridens* para o comparativo entre as espécies. Os parâmetros analisados foram: duração da sequência de pulsos (*chirps*), intervalo entre *chirps*, ciclo das estridulações e frequências principais. Apenas *Atta sexdens rubropilosa* diferiu das demais em relação ao tempo da estridulação, tendo o intervalo maior, o qual foi a única variável mensurada que diferenciou ( $H= 10.5732$ ;  $p=0.0143$ ), e quanto às frequências principais *A. bisphaerica* diferiu das outras na sequência de pulsos ( $H= 14.4546$ ;  $p= 0.0019$ ). A estridulação para formigas geralmente é utilizada como uma ferramenta para diferenciação das espécies, porém para as quatro espécies estudadas de *Atta* sp. os parâmetros avaliados não foram instrumentos eficientes para a separação das mesmas dentro do gênero.

**Palavras chave:** *Atta*, estridulação, diferenciação de espécies.

### 3.2.1. Introdução

As formigas cortadeiras como insetos eussociais apresentam uma unidade social que é composta por castas de indivíduos com funções especializadas onde há sobreposição de gerações, polimorfismo e polietismo etário em um sofisticado sistema de comunicação. Estas formigas baseiam este sistema por meio químico e por som, sendo estes, mecanismos bem elaborados (HÖLLDOBLER e WILSON, 2009).

Das cerca de 240 espécies pertencentes a tribo Attini, o som produzido por operárias foi caracterizado e analisado apenas em duas espécies: *Atta cephalotes* e *Acromyrmex octospinosus* (MARKL, 1965; KERMARREC et al., 1976). Assim, o presente estudo teve como objetivo diferenciar quatro espécies de saúvas do estado de São Paulo: *Atta laevigata*, *Atta capiguara*, *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica* por meio do perfil de estridulação das mesmas.

### 3.2.2. Material e Métodos

O experimento foi realizado no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro. Para isso, utilizou-se 10 fêmeas não fecundadas, amostradas de duas colônias diferentes (5 de cada), sendo três repetições das estridulações de cada indivíduo. As fêmeas não fecundadas foram coletadas antes da revoada em seu ninho de origem nos municípios de Botucatu e Rio Claro. Foram levadas ao laboratório (CEIS), submetidas a estresse e suas vibrações registradas.

O registro das vibrações sonoras foi realizado com o auxílio de um vibrômetro a laser, modelo PDV 100 Polytec (Figura 1) que foi apontado para o gáster da fêmea, quando as mesmas estavam submetidas a condições de estresse, ou seja, foram aprisionadas e impedidas de transitarem (Figura 2). As observações duraram 12.8 segundos por repetição, ou seja, 38.4 segundos por indivíduo. Os padrões de vibrações foram registrados pelo software VibSoft 4.6, transformados em “sound track” (.wav) e analisados pelo software Raven 1.4.

Além disso, os indivíduos foram preservados para realizar a Microscopia Eletrônica de Varredura do órgão estridulador, das estrias e da *pars stridens* para a comparação entre as espécies. O perfil de estridulação das espécies foi realizado quando as fêmeas não fecundadas eram submetidas a estresse, analisando os seguintes parâmetros: duração de sequência de pulso (*chirps*), duração do intervalo (*inter-chirps*), duração do ciclo e as frequências principais.



**Figura 1.** Laboratório de som do Centro de estudos de Insetos Sociais (CEIS), UNESP-Rio Claro.



**Figura 2.** Registro da estridulação produzida por fêmeas não fecundadas de *A. capiguara* sob condição de estresse.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Em seguida, foram realizadas as seguintes análises: Componentes Principais e Teste de Kruskal-Wallis (BIOESTAT, 2011 e Programa PAST: HAMMER, et al. 2001).

### 3.2.3. Resultados e Discussão

Os oscilogramas das quatro espécies analisadas diferem (Figuras 3 a 6); contudo o perfil de estridulação é muito variável, diferindo entre si dentro de cada espécie e de cada amostragem. Assim ao analisar os parâmetros de duração da sequência de pulsos, intervalo e ciclo observam-se altos desvios padrões, devido a grande variabilidade dos dados dentro das espécies analisadas. Por exemplo, para *A. sexdens rubropilosa* a duração do pulso variou de  $59.28 \pm 49.15$  a  $153.33 \pm 50.21$  ms, para *A. capiguara* os valores foram de  $60.37 \pm 42.35$  a  $131.57 \pm 74.73$  ms, em *A. laevigata* a variação foi de  $54.48 \pm 47.79$  a  $140.98 \pm 93.63$  ms, enquanto que para *A. bisphaerica* os registros variaram ainda mais de  $70.14 \pm 29.14$  a  $217.44 \pm 166.65$  ms, portanto no comparativo entre as espécies não ocorreu diferença significativa ( $H=5.9298$ ;  $p=0.1151$ ) (Figura 7 e 8), ou seja não foi possível detectar um padrão.

Pela Análise dos Componentes Principais, não foi possível distinguir as quatro espécies, pois as mesmas se apresentaram agrupadas (Figura 7), sendo que a componente 1 (duração do pulso) foi a variância que mais contribuiu para esses dados com 44.14%; seguida pela duração do intervalo com 39.86% de variância. Ferreira et al. (2010) observaram algo totalmente diferente, pois verificaram que os sinais acústicos são distintos para espécies simpátricas, juntamente com diferenças morfológicas e genéticas caracterizaram *Pachycondylla apicalis* em um complexo de no mínimo 6 espécies.

Durante o intervalo das estridulações ficou visível na Figura 4 uma baixa amplitude corroborando com os dados de Markl (1968) e o experimento 3.1 (padrão de estridulação de operárias de *A. sexdens rubropilosa*), em que durante o abaixamento do gáster, o plectro toca pouco ou quase nada nas estrias da *pars stridens*. Para a análise das variáveis separadamente, a duração de inter-*chirps* nas espécies diferiu significativamente, sendo que *A. sexdens rubropilosa* difere das demais, possuindo um intervalo maior entre *chirps* ( $H= 10.5732$ ;  $p=0.0143$ ), por meio da Figura 5 é possível visualizar isso no oscilograma. Quando foi comparada a duração dos ciclos de estridulações das quatro espécies, não se verificou uma diferença significativa,  $H=6.3527$ ;  $p=0.0957$ .

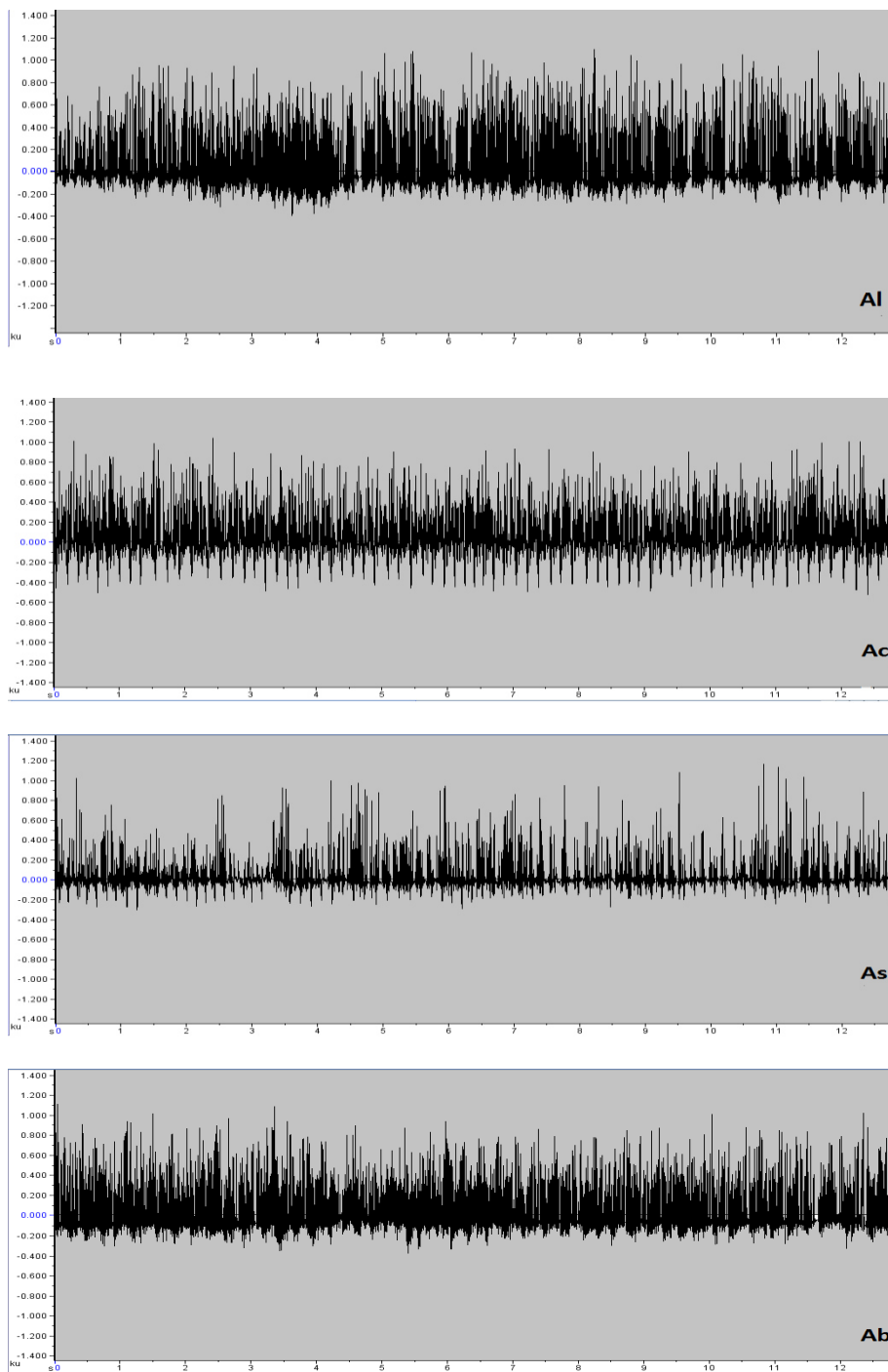
Já em relação às frequências principais mensuradas, apenas *Atta bisphaerica* diferiu das demais ( $H= 14.4546$ ;  $p= 0.0019$ ). A duração da sequência de pulsos é maior comparado com as outras saúvas estudadas, apesar de não diferirem estatisticamente, sendo as

frequências mais baixas nesta variável quando comparadas com as frequências das outras espécies. Contudo, calculando a moda para todas as espécies, elas estridulam em 172.3 Hz.

O número de estrias presentes no órgão estridulador também foi descrito para cada espécie (Tabela 1, Figuras 9 a 13), apesar de não se saber o número de estrias que estão envolvidas na produção da estridulação, nota-se que para as cortadeiras de monocotiledôneas, *Atta capiguara* e *Atta bisphaerica*, o número entre ambas é semelhante e difere entre as outras duas espécies, uma que corta dicotiledônea (*Atta sexdens rubropilosa*) e a outra, *A. laevigata* que corta tanto folhas largas como estreitas.

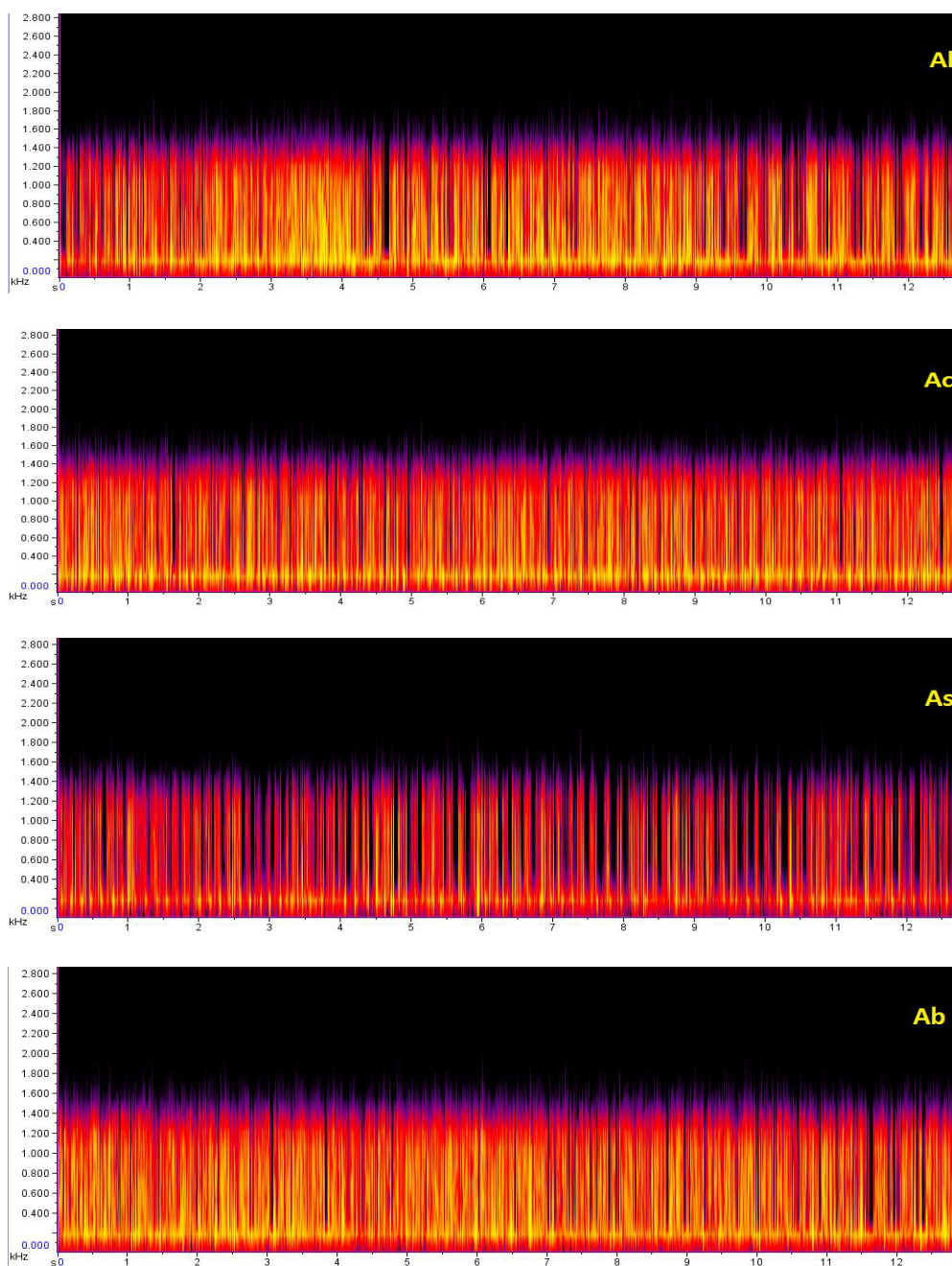
Talvez, existam outras variáveis do sinal estridulatório aqui não mensuradas que diferenciem as espécies e/ou realmente o sinal químico é o que mais caracteriza uma espécie, como já observado por Hölldobler e Wilson (2009) que as considera como os insetos das comunicações químicas, pois o corpo das mesmas é repleto de glândulas exócrinas com a função básica de produzir feromônios. Sendo assim, seus sinais sonoros pouco se diferenciaram para um grupo derivado. Além disso, como descrito no capítulo 1, as quatro espécies apesar de possuírem hidrocarbonetos em comum diferem qualitativamente e quantitativamente nestes compostos corroborando que os sinais químicos podem ser mais importantes do que os sonoros para formigas cortadeiras.

Hölldobler e Roces (2001) em seus estudos evolutivos sobre a estridulação, analisaram que este sinal é importante em pequenas distâncias para a comunicação entre as operárias. Contudo, quando o mesmo está associado a sinais químicos a resposta no número de formigas recrutadas é ainda maior. Deve-se também enfatizar que a casta estudada, fêmeas não fecundadas do gênero *Atta*, após a revoada e fundação colonial com modo claustral, exercem atividades relativas as operárias, além de cuidados com a prole, auto-limpeza e com o simbionte; posteriormente ao desenvolvimento ergonômico, elas possuem a função primordial de postura dos ovos. Sendo assim, elas podem não desenvolver sinais mais elaborados que as pudessem diferenciar quanto comparadas às castas operárias, que possuem várias tarefas no decorrer do seu tempo de vida, tais como: sair do ninho para a coleta e transporte de substratos vegetais; processamento e incorporação desse material no fungo simbionte, necessitando, portanto, ter seus meios de comunicação mais elaborados para a coordenação e desenvolvimento colonial do que as fêmeas não fecundadas.

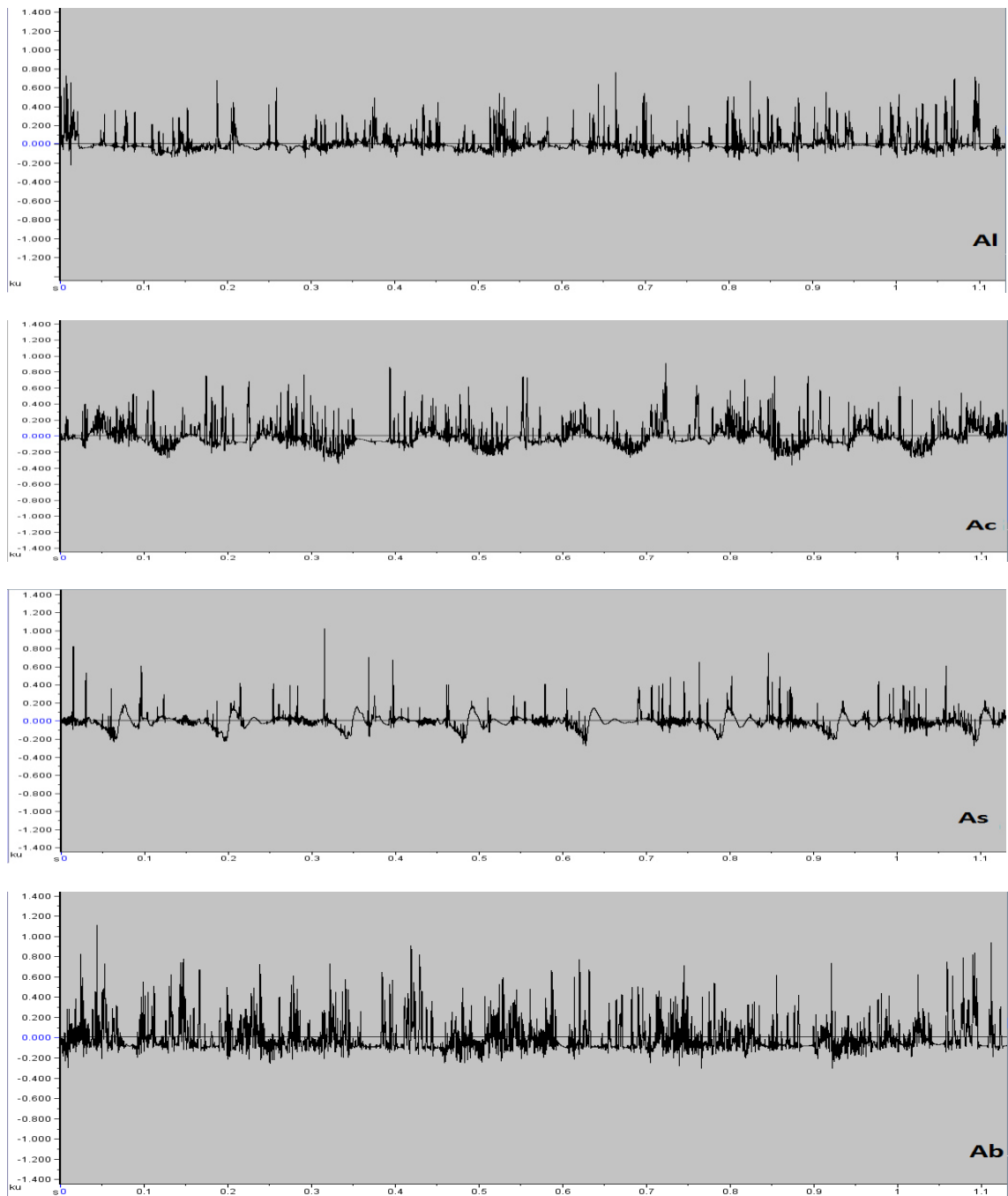


**Figura 3.** Perfil de estridulação de *Atta laevigata*, *Atta capiguara*, *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica* em 12.8 segundos, contendo vários ciclos. Legenda: Al - *Atta laevigata*; Ac - *Atta capiguara*; As - *Atta sexdens rubropilosa* e Ab - *Atta bisphaerica*.

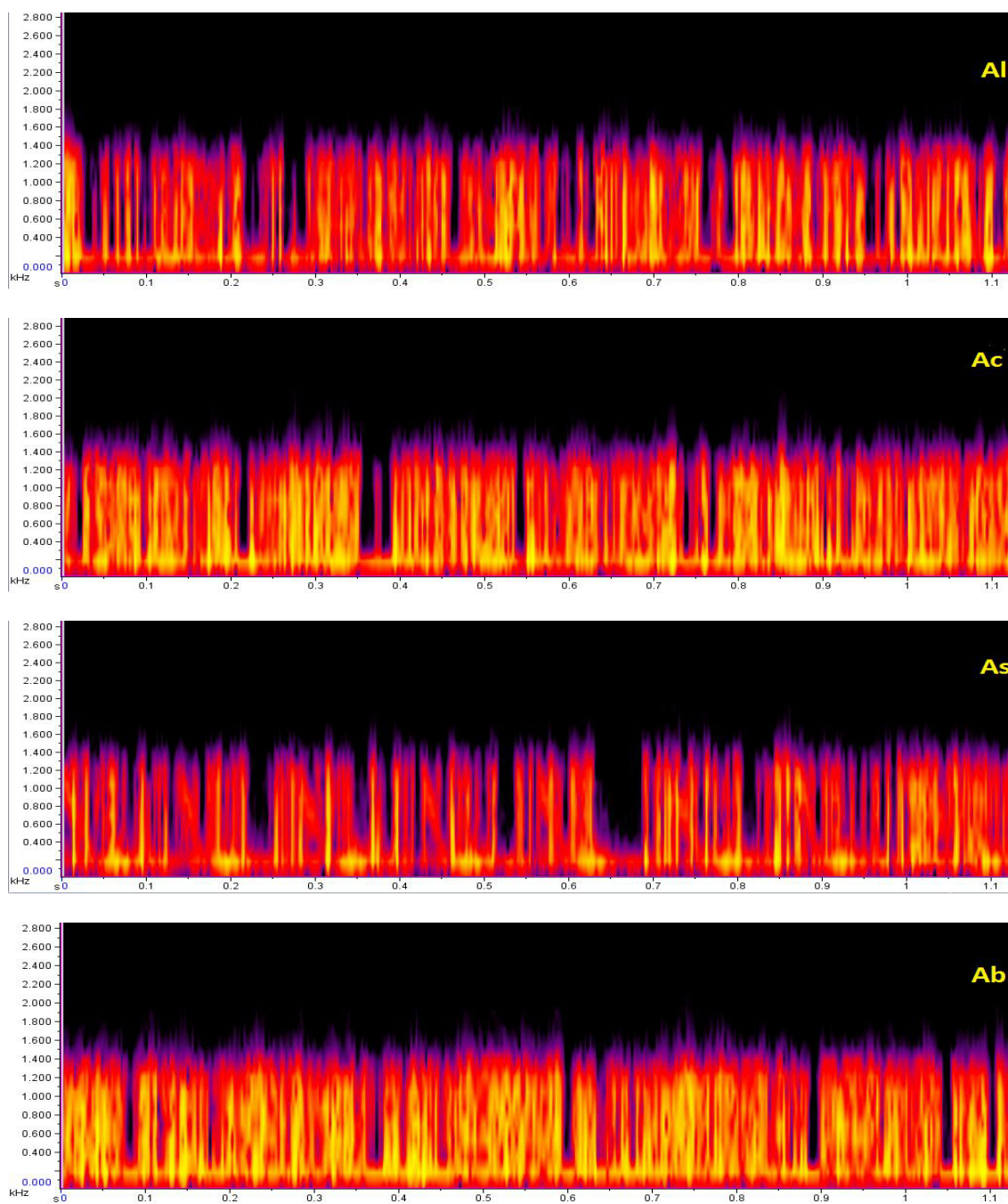




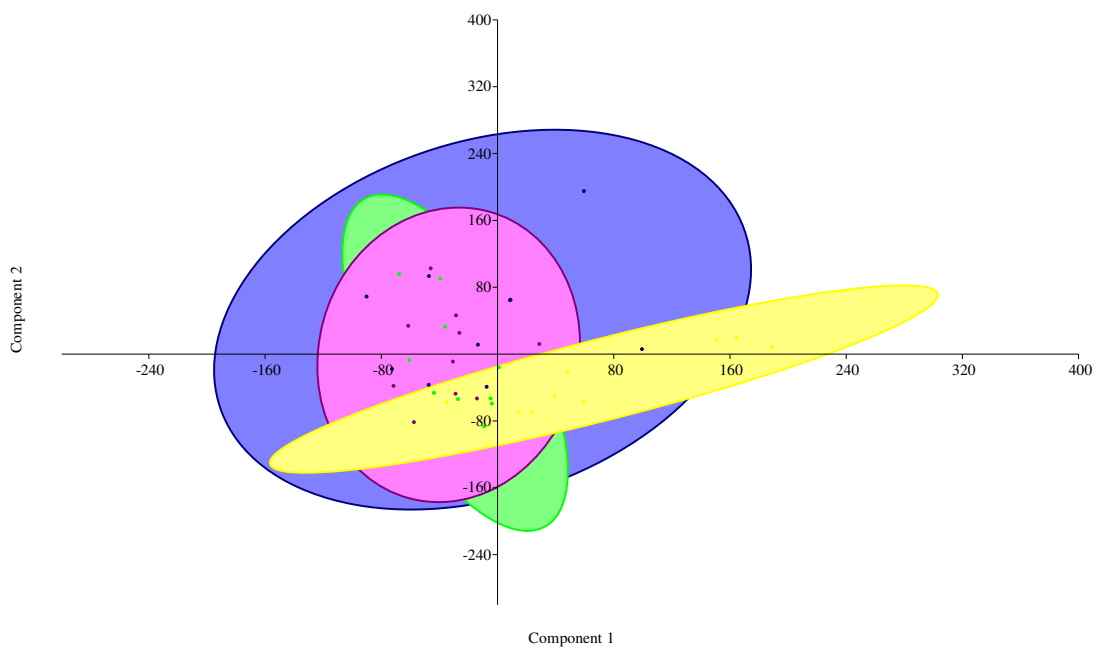
**Figura 4.** Perfil de estridulação com detalhes das frequências principais de *Atta laevigata*, *Atta capiguara*, *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica* em 12.8 segundos. Legenda: A1 - *Atta laevigata*; Ac - *Atta capiguara*; As - *Atta sexdens rubropilosa* e Ab - *Atta bisphaerica*.



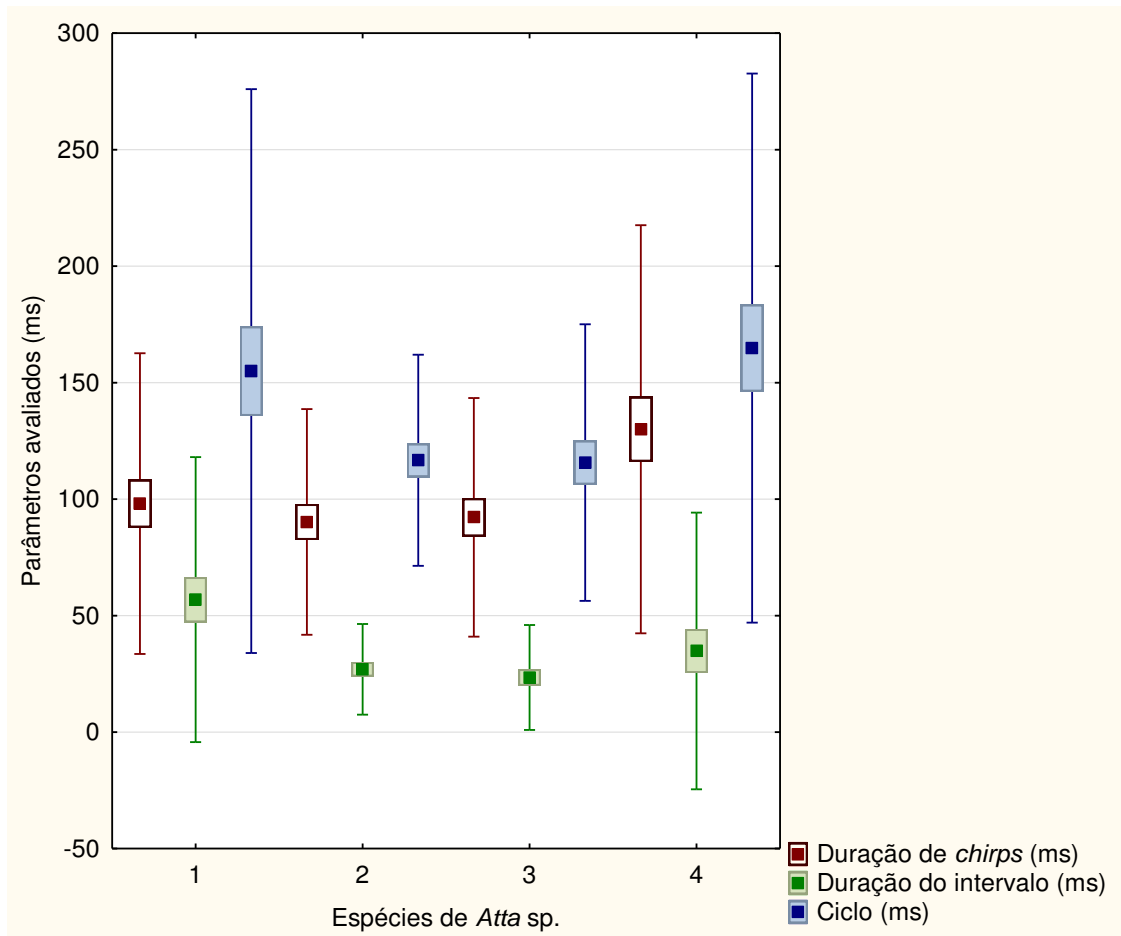
**Figura 5** Perfil de estridulação de *Atta laevigata*, *Atta capiguara*, *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica* em 1.1 segundos, contendo vários ciclos. Legenda: Al - *Atta laevigata*; Ac - *Atta capiguara*; As - *Atta sexdens rubropilosa* e Ab - *Atta bisphaerica*.



**Figura 6.** Perfil de estridulação com detalhes das frequências principais de *Atta laevigata*, *Atta capiguara*, *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica* em 1.1 segundos. Legenda: A1 - *Atta laevigata*; Ac - *Atta capiguara*; As - *Atta sexdens rubropilosa* e Ab - *Atta bisphaerica*.



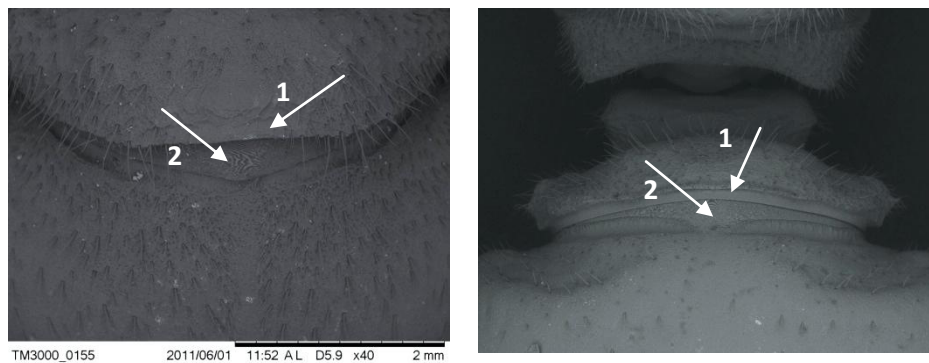
**Figura 7.** Análise dos componentes principais. Legendadas: *Atta laevigata* (amarela); *Atta capiguara* (verde); *Atta sexdens rubropilosa* (rosa) e *Atta bisphaerica* (azul).



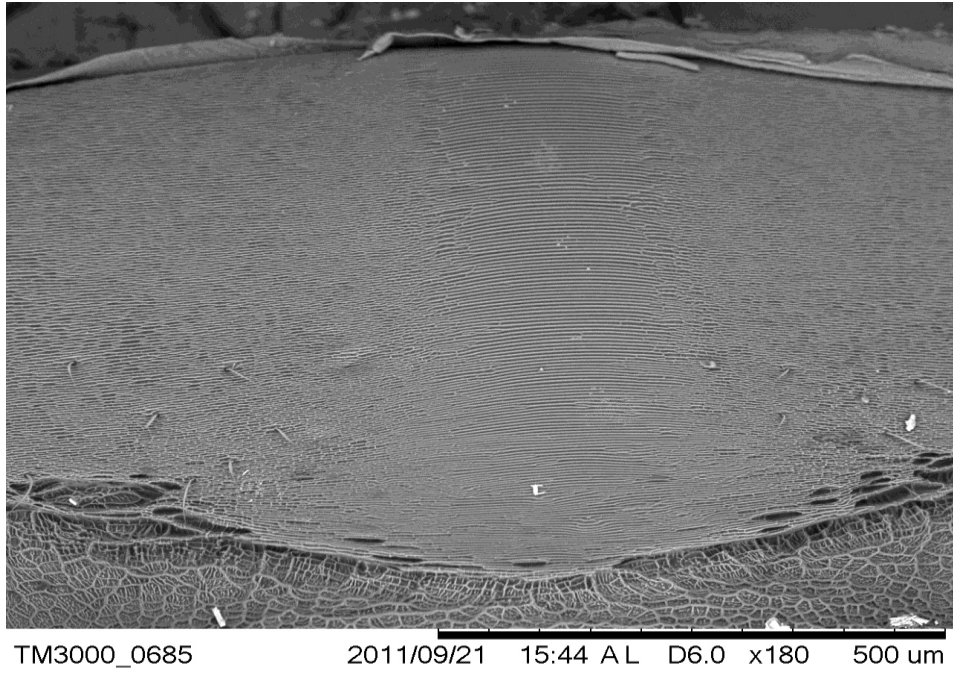
**Figura 8.** Comparativo das médias da duração do tempo de estridulação para as espécies estudadas. **Legenda:** Espécie 1- *Atta sexdens rubropilosa*; Espécie 2- *Atta capiguara*; Espécie 3- *Atta laevigata*; Espécie 4: *Atta bisphaerica*.

**Tabela 1.** Comparativo dos sinais sonoros entre quatro espécies de *Atta* sp.

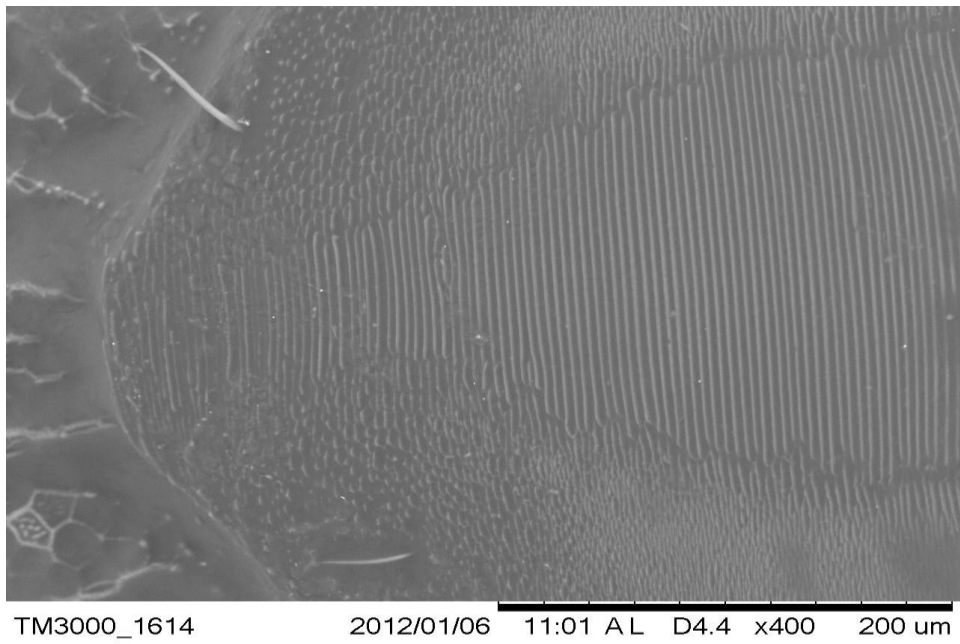
Espécie	<i>Chirps</i> (ms)	Intervalo (ms)	Ciclo (ms)	Taxa de repetição do ciclo (ciclos/segundos)	Frequência principal pulso	Nº de estrias
<i>Atta laevigata</i>	92.20±81.84	23.47±26,12	115.67±100.93	9.18±2.40	257.04±144.40	203.66±5.67
<i>Atta capiguara</i>	90.20±57.83	26.96±20.54	116.69±61.37	8.85±1.65	244.85±138.61	167.16±12.18
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	98.076±50.50	56.86±47.58	154±73.53	7.31±2.60	276.04±144.40	183.3±5.03
<i>Atta bisphaerica</i>	130.00±43.80	34.83±29.68	164.83±58.92	6.78±2.31	187.11±63.92	167.5±14.73



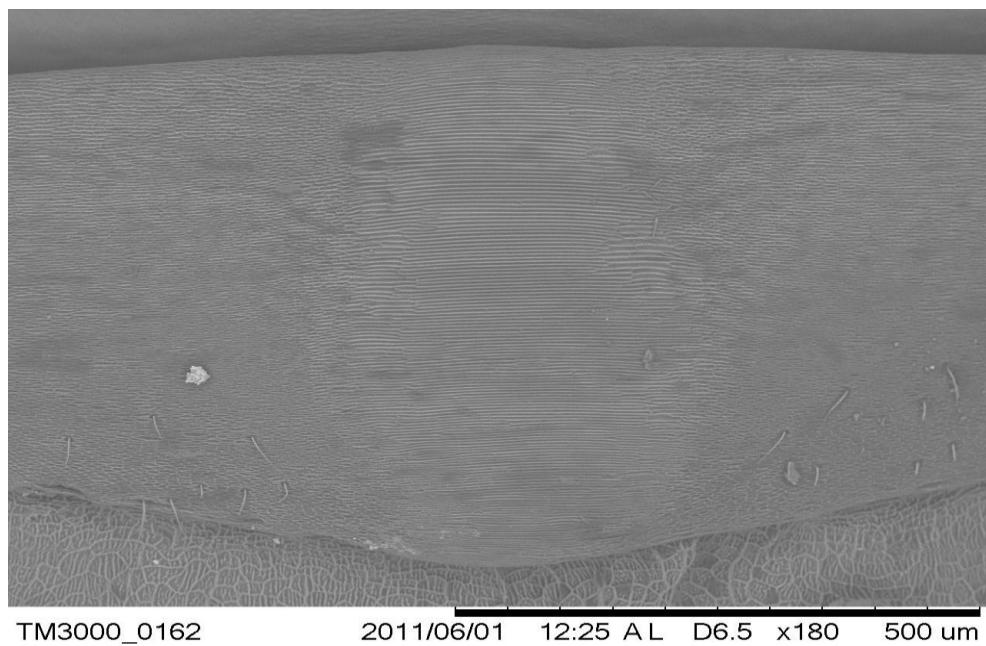
**Figura 9.** Visão geral do órgão estridulador de *A. bisphaerica*. **Legenda.** Órgão estridulador: 1. plectro - projeção cuticular presente no tergito do 3º segmento abdominal, ou seja, no pós-peciolo e 2. *pars stridens* - conjunto de estrias paralelas presente no gáster, que é o 4º segmento abdominal).



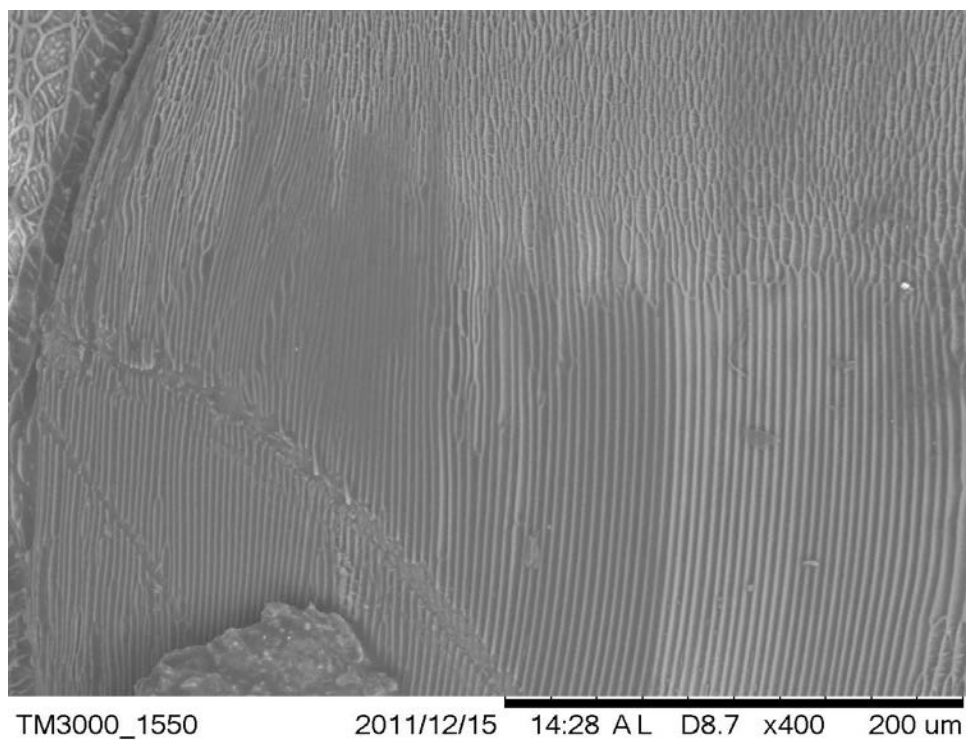
**Figura 10.** Estrias do órgão estridulador de *A. bisphaerica*.



**Figura 11.** Estrias do órgão estridulador de *Atta capiguara*.



**Figura 12.** Estrias do órgão estridulador de *Atta laevigata*.



**Figura 13.** Estrias do órgão estridulador de *Atta sexdens rubropilosa*.



No item anterior deste capítulo, para operárias, é possível diferenciar *Atta sexdens rubropilosa* de duas espécies intermediárias, *Trachymyrmex tucumanus* e *Trachymyrmex fuscus* e dentre as intermediárias que apresentaram padrões característicos de estridulação distintos entre elas. Assim, pode-se sugerir que a estridulação das operárias, entre as espécies de *Atta* pode ser específica para cada espécie.

Assim, no presente trabalho, dentro do gênero *Atta*, comparando as fêmeas não fecundadas das quatro espécies de ocorrência no Estado de São Paulo, não foi possível caracterizá-las por meio das variáveis estudadas (duração de sequência de pulso (*chirps*), duração do intervalo (*inter-chirps*), duração do ciclo e as frequências principais). Apesar da duração do intervalo e as frequências principais descritas distinguirem duas espécies (*A. sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica*) respectivamente, porém, quando as mesmas são analisadas conjuntamente não ocorre diferenciação das saúvas estudadas.

### 3.2.4. Referências Bibliográficas

BIOESTAT Versão 5.3. (<http://www.mamiraua.org.br/pt-br/downloads>), 2011.

FERREIRA, R. et al. Stridulation Reveal Cryptic Speciation in Neotropical Sympatric Ants. **Plos ONE** v.5, n.12 p.1-11, 2010

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies**. 521p., 2009.

HÖLLDOBLER, B.; ROCES, F The behavioral ecology of stridulatory communication in leaf-cutting ants. **Model systems in behavioral ecology – Integrating conceptual, theoretical and empirical approaches**. ed. By L.A. Dugatkin, Princeton, Princeton University Press, p. 92-109, 2001.

KERMARREC, A.; MAULEON, H.; ANTUN, A.A. La stridulation de *Acromyrmex octospinosus* Reich. (Hymenoptera: Formicidae): Biométrie de l'appareil stridulateur et analyse du signal produit. **Insectes Sociaux**. v.23, p.29-48, 1976.

MARKL, H. Die Verständigung durch Stridulationssignale bei Blattschneiderameisen II. Erzeugung und Eigenschaften der Signale. **Zeitschrift für vergleichende Physiologie** v.69. p.6-37, 1968.

MARKL, H. Stridulation in leaf cutting ants. **Science**. v.149, p.1392-1393, 1965.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T. ; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** v4, n.1, 9pp, 2001. (Programa **PAST**)

RAVEN PRO. Version 1.4. Bioacoustics Research Program. **Raven Pro: Interaction Sound Analysis software** (Version 1.4) (Computer Software). Ithaca, NY: The Cornell Lab. Of Ornithology. [http:// www.birds.cornell.edu/raven](http://www.birds.cornell.edu/raven), 2011.

VIBSOFT 4.7. **Polytec Vibrometer Software**, Polytec GmbH, Waldbronn, 1997-2009.

### **3.3. Diferenciação de castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) pelo perfil sonoro.**

#### **Resumo**

A produção de um sinal sonoro pelas formigas mediam vários comportamentos no forrageamento, na defesa da colônia e na construção do ninho. Levando-se em conta os resultados obtidos anteriormente (item 3.2), onde fêmeas não fecundadas das espécies do gênero *Atta* não apresentaram distinção clara entre elas, o objetivo do presente estudo foi comparar a estridulação produzida entre as diferentes castas de uma mesma espécie. Para isso, elas foram submetidas a condições de estresse, ou seja, aprisionadas, sendo impedidas de transitarem e tiveram seu padrão de estridulação descrito. Castas de *A. sexdens rubropilosa* foram analisadas: soldados, forrageiras, machos, fêmeas não fecundadas e rainhas, analisando os seguintes parâmetros durante a estridulação: duração da sequência de pulsos (*chirps*), intervalo entre *chirps*; além das frequências principais exibidas. O que se pode observar é que ocorre um agrupamento entre castas reprodutoras e outro entre forrageiras e soldados. A frequência principal observada foi de 172.3 Hz para as cinco castas estudadas. Por análise das componentes principais, verificou-se que as variáveis mensuradas que contribuíram para esse agrupamento foram a duração de *chirps* e a duração do intervalo: variâncias para C1 de 76.74% e C2 de 19.03%. Este estudo permitiu verificar que as castas diferem entre si na produção da estridulação quando submetidas a estresse, em grupamentos distintos: um de castas reprodutoras (machos e rainhas) ou que poderiam desempenhar esse papel (fêmeas não fecundadas) e outro, as que não se reproduzem, ou seja, operárias (forrageiras e soldados). Isso ocorre provavelmente devido ao papel que os indivíduos desempenham na colônia, além talvez de suas diferenças morfológicas.

**Palavras chave:** estridulação, castas.

### 3.3.1. Introdução

Dependendo da folha a ser forrageada: monocotiledôneas ou eudicotiledôneas e magnoliídeas, como fonte para o desenvolvimento do fungo simbiote, as operárias de *Atta* spp. diferem morfológicamente. Para as cortadeiras de monocotiledôneas as mandíbulas são fortes e curtas, enquanto as de eudicotiledôneas e magnoliídeas possuem mandíbulas mais longas e menos robustas e são distintas no preparo do substrato e na arquitetura de ninhos (ZAMITH, et al. 1961; FOWLER et al, 1986).

A divisão de trabalho dentro da colônia gênero *Atta* está relacionada ao polimorfismo em formigas cortadeiras, sendo que esse processo envolve uma série de tarefas específicas de acordo com o tamanho corpóreo do indivíduo (WILSON, 1980). Dentro de uma colônia já se sabe que os sinais químicos são de vital importância, sendo intraespecíficos e distintos entre castas e dependendo do sinal emitido podem mediar diversos comportamentos, como por exemplo, no forrageamento, a casta escoteira possui um padrão comportamental que faz com que ela localize a fonte e recrute outras operárias e estas por sua vez, auxiliam na amplificação do sinal de descoberta da fonte apropriada, com a remarcação e manutenção das trilhas químicas, auxiliando, portanto, na eficácia do forrageio (JAFFÉ e DENEUBOURG, 1992).

Além dessa percepção química, outra forma de comunicação importante existente nesta sociedade é por meio da estridulação (ROCES et al., 1993; HÖLLDOBLER e WILSON, 2009). A estridulação ocorre durante a fricção de duas partes do corpo esclerotizadas, sendo no caso das formigas os 3º e 4º segmentos abdominais resultando em um som fragmentado (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

Nos estudos mais recentes sobre o tema, com *Atta sexdens*, os pesquisadores enfatizaram os comportamentos de forrageio, escavação e como esse sinal é transmitido (ROCES et al., 1993; TAUTZ et al., 1995; ROCES e HÖLLDOBLER, 1995; ROCES e HÖLLDOBLER, 1996; ROCES e TAUTZ, 2001). Em trabalhos mais antigos descreveram o órgão estridulador e o perfil sonoro de apenas duas espécies, sendo elas, *Atta cephalotes* e *Acromyrmex octospinosus* (MARKL, 1965; KERMARREC et al., 1976; MARKL, 1968). Portanto, o presente estudo tem como objetivo caracterizar as distintas castas de *Atta sexdens rubropilosa* pelo perfil de estridulação, e compreender melhor como isso pode influenciar nos comportamentos que os sinais acústicos mediam.

### 3.3.2. Material e Métodos

O estudo foi realizado no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro. Para isso utilizou-se 10 indivíduos de cada casta: fêmeas fecundadas, fêmeas não fecundadas, machos, forrageiras e soldados; sendo amostradas de duas colônias diferentes (5 de cada), sendo três repetições das estridulações para cada indivíduo. Os indivíduos foram coletados em dois ninhos distintos no município de Rio Claro antes da revoada e as rainhas foram capturadas 7 dias após a fecundação. Foram levadas ao laboratório (CEIS), submetidas a estresse e tiveram suas vibrações registradas.

O registro das vibrações sonoras foi realizado com o auxílio de um vibrômetro a laser, modelo PDV 100 Polytec que foi apontado para o gáster dos indivíduos, quando os mesmos estavam submetidos a condições de estresse, ou seja, foram aprisionados, sendo impedidos de transitarem. As observações duraram 12.8 segundos por repetição, ou seja, 38.4 segundos por indivíduo, os padrões de vibrações foram registrados pelo software VibSoft 4.6, transformados em “sound track” (.wav) e analisados pelo software Raven 1.4. Os parâmetros temporais avaliados foram: *chirps* (conjunto ou sequência de pulsos), *inter-chirps* (intervalo entre *chirps*), ciclos (*chirps* + intervalo), taxa de repetição dos ciclos/segundos e frequência principal. Os dados foram submetidos às Análises de Componentes Principais (Programa PAST: HAMMER, et al. 2001).

### 3.3.3. Resultados e Discussão

Os dados permitiram verificar que as castas reprodutoras se distinguem das outras nos fatores que norteiam o tempo e as frequências principais amostradas (Figura 1). Por meio da Figura 1, é possível visualizar que as castas reprodutoras possuem um intervalo de tempo menor dentre todas; já forrageiras e soldados, apresentam a duração de *chirps* menor e o intervalo maior, seguindo o padrão descrito para formigas e outros insetos, e estas mesmas castas possuem as frequências maiores quando comparadas as fêmeas e machos reprodutores.

Geralmente para insetos, a duração do intervalo entre *chirps* é maior, contudo para os reprodutores de *Atta sexdens rubropilosa* o mesmo não foi observado, ou seja, após o levantamento do gáster que gera a estridulação quando o plectro entra em atrito com as *pars estridens*, ocorre o abaixamento do gáster e posteriormente novo levantamento e assim, uma nova sequência de pulsos. Este intervalo entre *chirps* é mais rápido do que o observado para outras espécies de formigas e para as outras castas (forrageiras e soldados) estudadas no presente trabalho. Mas vale ressaltar que a maioria dos estudos com outras formigas foram realizados com a casta operária, e em *Atta cephalotes* e *A. octospinosus* (KERMARREC et al. 1976; MARKL, 1968) não foram mensurados os intervalos de *chirps* dos reprodutores estudados.

Por meio dos dados do presente trabalho, nota-se que os reprodutores possuem a capacidade de repetir mais vezes o movimento, em fêmeas não fecundadas a taxa de repetição do ciclo dado em ciclos/segundos é de  $7.31 \pm 2.60$ ; para as rainhas é de  $7.12 \pm 1.52$  e em machos  $7.01 \pm 1.95$ . A taxa de repetição para os não reprodutores é de  $5.96 \pm 1.11$  para operárias e  $6.88 \pm 1.83$  para soldados. Para *Acromyrmex octospinosus* a taxa de repetição de *chirps*/segundo foram medidas, em rainhas, sendo 7.05 (KERMARREC et al., 1976), porém estas medições foram feitas com microfone e não vibrômetro como no presente estudo.

Em relação às frequências, em soldados esta variou de 86.1 a 689.10 Hz, sendo que os nove indivíduos tiveram os sinais dominantes em 172.3 Hz (76.60%), apenas uma amostra teve 70% do sinal estridulatório em 86.1 Hz. Para as forrageiras, o mínimo e a frequência dominante foi de 172.3 Hz (63.27%), sendo o maior valor de 861.3 (1.47%) Hz. Nos outros três indivíduos, a frequência dominante também foi de 172.3 Hz (93.56 % fêmeas não fecundadas; 73.33% rainhas e 71.87% machos); para fêmeas fecundadas a frequência não ultrapassou de 512.5 Hz, para machos 344.5 e em fêmeas não fecundadas 861.3 (Figura 2).

Para fêmeas não fecundadas de *Atta laevigata*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta capiguara* e *Atta bisphaerica* no estudo anterior (item 3.2) observou-se a mesma frequência dominante registradas no órgão estridulador de 172.3 para as quatro espécies.

Em estudos com *Atta cephalotes* verificou-se que a faixa de frequência variou de 700 a 1000 Hz, com extremos de 540 e 2640, já para *Acromyrmex octospinosus* a variação foi de 200 a 300 Hz (Markl, 1968), estas frequências observadas foram feitas com medições por meio de microfone, via aérea. Já para o presente estudo, em *A. sexdens rubropilosa*, a faixa de caracterização em que as castas estridularam não excedeu de 861 Hz.

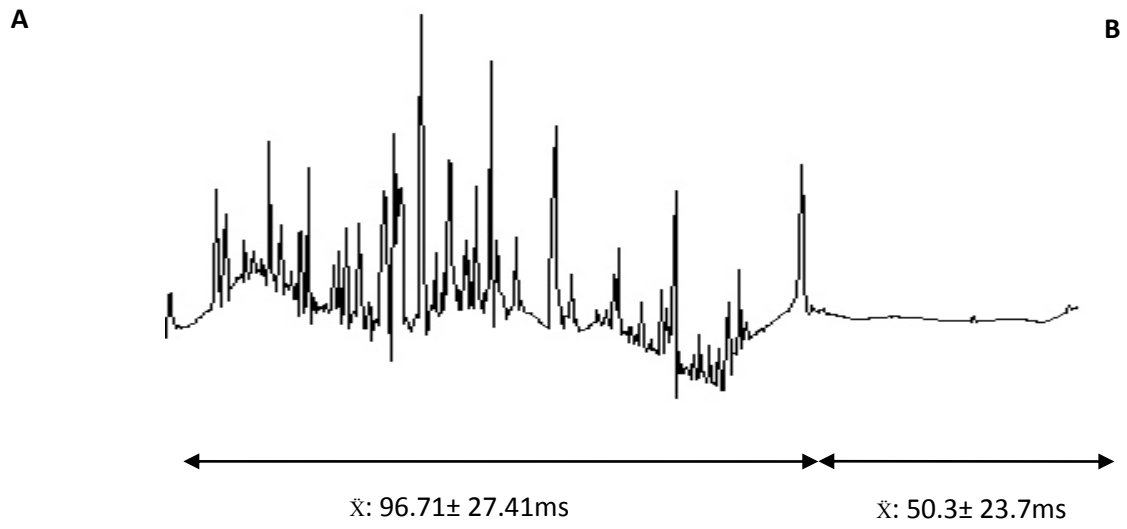
Para soldados de *Atta cephalotes* quando impedidos de transitarem livremente produziram um grupo de pulsos (denominação que o pesquisador utilizou para *chirps*) de 39 a 50 milissegundos (Markl, 1965), em *A. sexdens rubropilosa* a média foi de 70.37 da duração de *chirps* e 89.63 para inter-*chirps* (Figura 1). Já para as operárias ao se comparar com *A. cephalotes*, Markl (1968), dividiu as operárias em quatro classes de tamanho, obtendo valores de 17.50 a 84.8 milissegundos, com intervalos que variaram de 84.8 a 218.6 milissegundos para operárias de 3.0 a 15 mm. Mas de uma maneira geral, o mesmo autor descreve que obteve uma variação de 40 a 50 milissegundos na duração de *chirps* e um intervalo de 100 a 150 milissegundos tanto para *A. cephalotes* quanto para *Acromyrmex octospinosus* (MARKL, 1968). No presente estudo para *A. sexdens rubropilosa* a média de duração de *chirps* foi de 73.18 e o intervalo de 110.12 milissegundos, tendo assim esta espécie, um tempo maior de *chirps* (Figura 1), um pouco fora dos limites para as duas espécies descritas do gênero por Markl (1968), contudo, deve ser levado em consideração que as metodologias de medições foram distintas.

No presente estudo, as estrias do órgão estridulador das castas não foram mensuradas, mas em um experimento anterior (item 3.1), foi verificado que as operárias fazem uso em média de  $19.33 \pm 5.03$  das estrias da *pars stridens*, já para *Atta cephalotes*, o número de estrias presentes no órgão das operárias variou de 78 a 85, dependendo da classe de tamanho das mesmas, porém não foi caracterizado o número de estrias envolvidas na estridulação (MARKL, 1968).

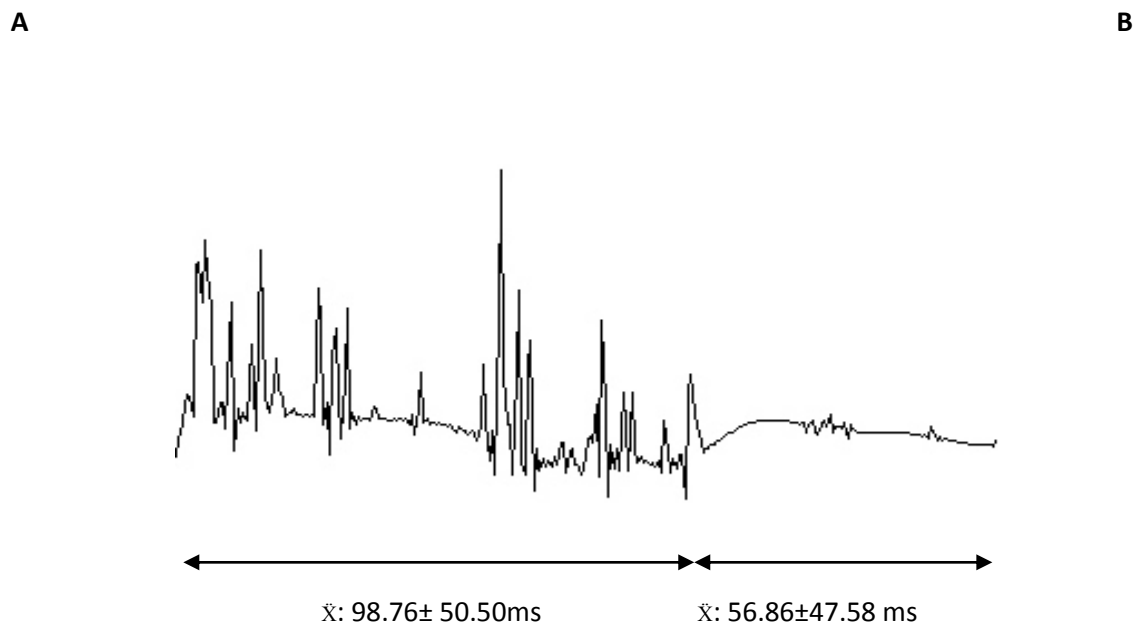
Em fêmeas não fecundadas de *Atta sexdens rubropilosa*, a média de estrias presentes no órgão estridulador foi de  $183.3 \pm 5.03$  (item 3.2), mas o número de pulsos não foi contabilizado, sendo a média da duração de *chirps* de  $96.71 \pm 27.41$  milissegundos; em *A.*

*cephalotes* contabilizou-se 126 estrias na *pars stridens*, com duração dos *chirps* de 128 milissegundos e para os machos 83 milissegundos e o *inter-chirps* como já mencionado, não foi caracterizado (MARKL, 1968). Kermarrec et al. (1976) para *Acromyrmex octospinosus* realizou a morfologia do órgão estridulador, medindo o raio da *pars stridens* e comparou-os entre castas, sendo maior para as rainhas, 394, seguido pelos machos 304 e entre as operárias variou de 52 a 176, dependendo do tamanho da operária.

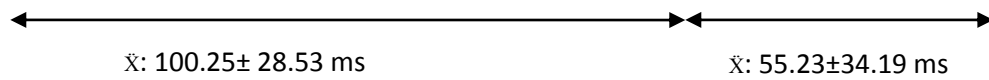
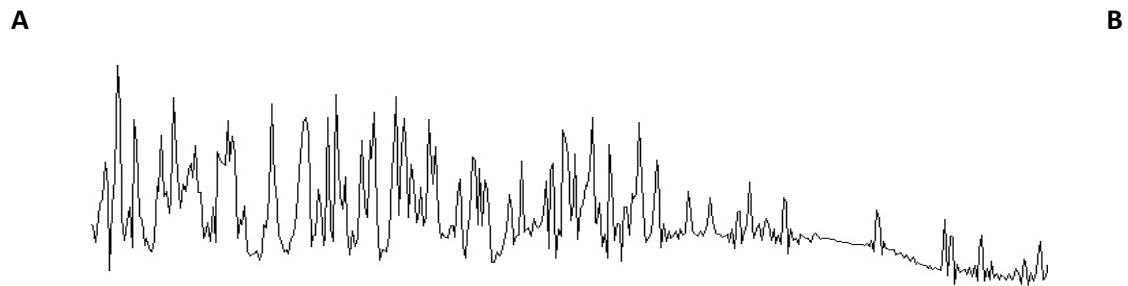




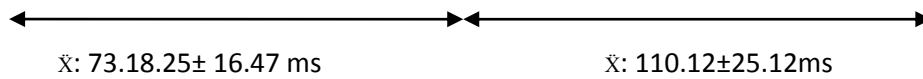
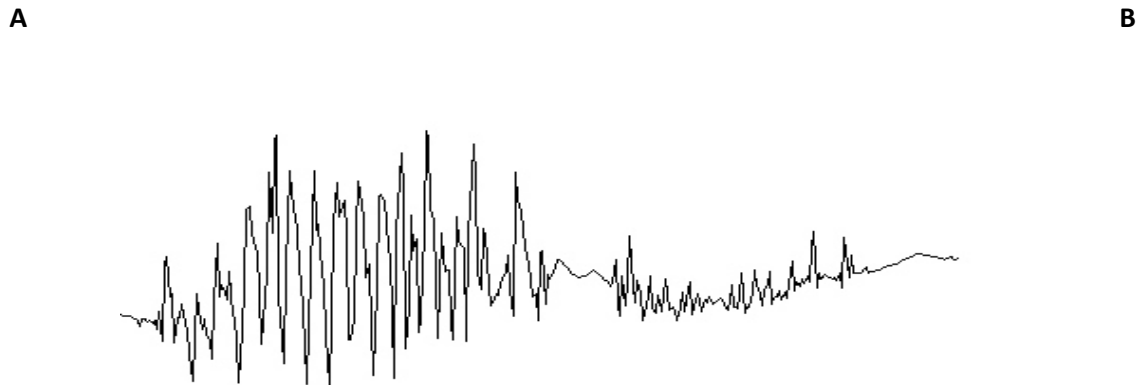
### 1. Fêmea fecundada



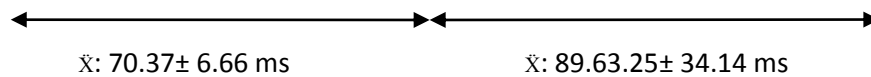
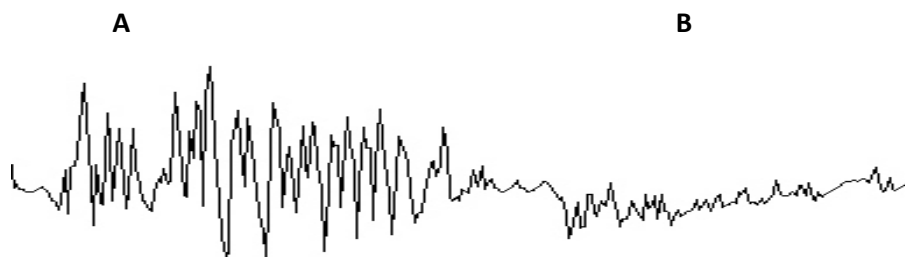
### 2. Fêmea não fecundada



### 3. Macho

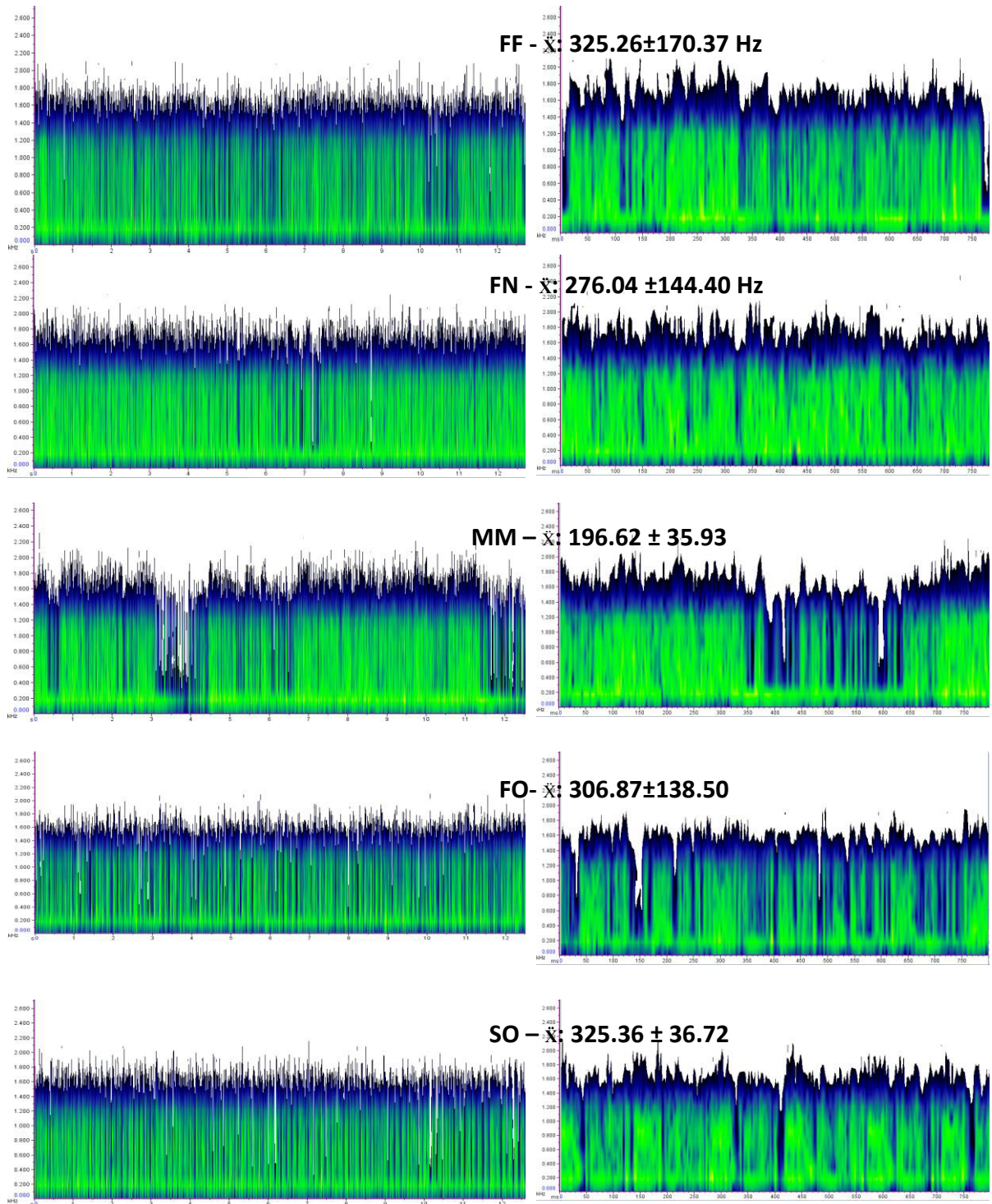


### 4. Forrageira

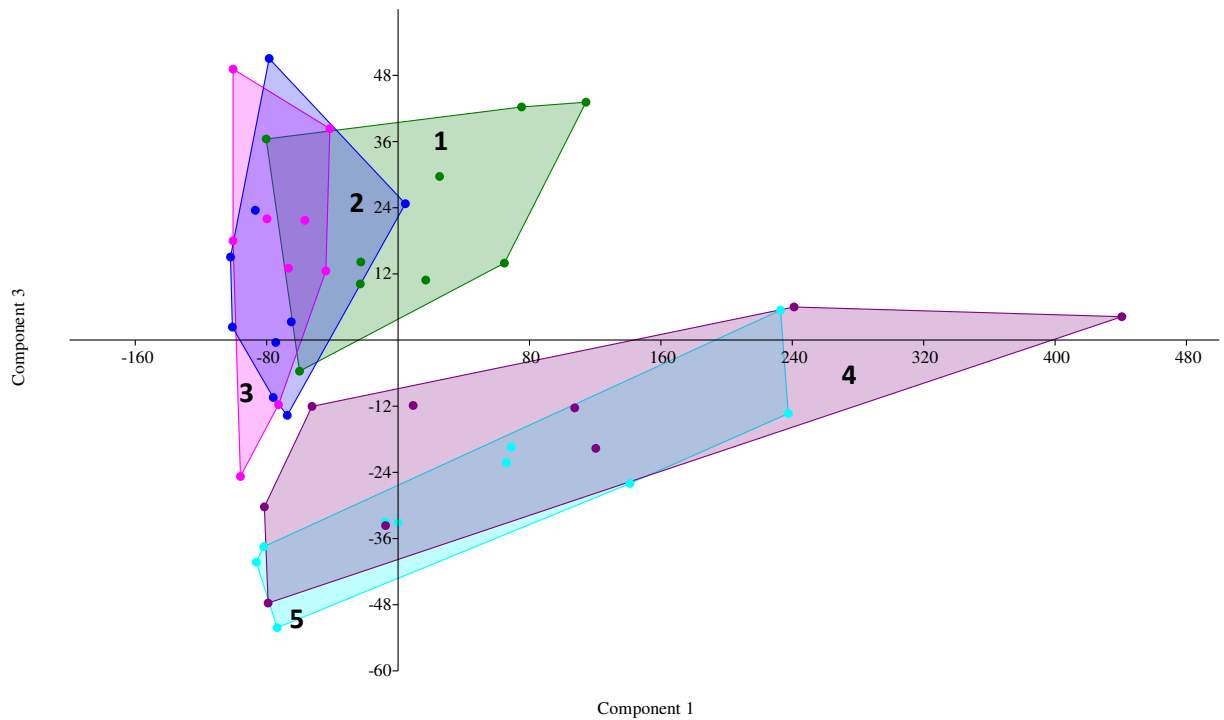


### 5. Soldado

**Figura 1.** Oscilograma de um sinal acústico produzido por diferentes castas de *A. sexdens rubropilosa*. Legenda a – chirps; b – Intervalo entre chirps.



**Figura 2.** Perfil de estridulação com detalhes das médias de frequências principais e desvios padrões de diferentes castas de *A. sexdens rubropilosa*. Legenda: FF – Fêmea fecundada; FN – Fêmea não fecundada; MM – Machos; FO- forrageiras; SO - Soldados. Em A, 12.8 segundos de frequências principais e em B, 0.008 segundos.



**Figura 3.** Análise das componentes principais. Componente 1: duração do pulso; componente 3: duração do ciclo (variâncias para C1 de 76.74% e C2 de 19.03%). Legenda 1. Fêmeas não fecundadas; 2. Fêmeas fecundadas; 3. Machos; 4. Soldados e 5. Forrageiras.

Os ciclos (*chirps* + intervalo), também foram caracterizados, sendo as médias: 180.98±24.81 - forrageiras; 155.59±45.44 - soldados; 154.38±58.14 - machos; 154.94±73.53 - fêmeas não fecundadas e 147.01±36.82 - rainhas. Por meio da Análise das Componentes Principais foi possível observar um agrupamento das castas reprodutoras e outro dos soldados e forrageiras. As componentes que contribuíram para esse agrupamento foram a duração da sequência de pulsos e a duração do intervalo, variâncias para C1 de 76.74% e C2 de 19.03%, respectivamente, embora graficamente as componentes que melhor ilustram são *chirps* e o ciclo (C3).

Como já discutido no experimento anterior (3.2), as rainhas e as que seriam futuras rainhas (fêmeas que foram coletadas antes da revoada), a maior parte de sua vida irão permanecer enclausuradas. Assim, o sinal de estridulação é distintamente utilizado por elas quando comparadas com as operárias, pois mediam comportamentos específicos para estes indivíduos que serão apenas executados no interior do ninho pós-revoada. Elas irão interagir com operárias, quando estas castas reprodutoras, necessitarem de alimentação, limpeza e auxílio pós-postura, por exemplo. Para machos, talvez os sinais acústicos aliados aos sinais químicos, possam ter algum papel também durante o momento da revoada.

Já as forrageiras, que atuam efetivamente na colônia, para a coleta, transporte e processamento do material vegetal para seu fungo simbiote, necessitam de mais ferramentas que aliadas ao sinal químico aumentem a eficiência também em campo e na manutenção colonial, assim como os soldados que estão auxiliando durante o forrageamento, sendo responsáveis pela defesa colonial. Ambos os indivíduos estão agrupados no mesmo padrão de emissão sonora que deve estar diretamente ligado às tarefas que eles desempenham.

Outro ponto a ser levantado é devido a massa corpórea e a morfologia do órgão estridulador, fatores estes que devem ter contribuído para este agrupamento de castas. Estudos que entendam os significados biológicos que são mediados pelo som produzidos são necessários, além de maiores esclarecimentos sobre a morfologia do órgão estridulador, ou seja, o número de estrias presentes para cada casta e o número de pulsos por *chirps* envolvidos no processo para a caracterização da espécie de *Atta sexdens rubropilosa*, embora os dados coletados tenham sido suficientes para o agrupamento das castas.

Assim, o presente trabalho verificou que por meio da estridulação, é possível separar as castas de *Atta sexdens rubropilosa*. Um grupo é representado por forrageiras e soldados e outro por machos, rainhas e fêmeas não fecundadas.

### 3.3.4. Referências Bibliográficas

- FOWLER, H. G.; PEREIRA-DA-SILVA, V.; SAES, N. B. Economics of grass-cutting ants, p. 18-35. *In*: C. S. Lofgren & R. K. Vander Meer (eds.) **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder, Westview Press, 435p, 1986.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** v4, n.1, 9p., 2001.
- JAFFÉ, K.; DENEUBOURG, J.L. On foraging, recruitment systems and optimum number of scouts in eusocial colonies. **Insectes Sociaux**, v.39, p.201-213, 1992.
- KERMARREC, A.; MAULEON, H.; ANTUN, A.A. La stridulation de *Acromyrmex octospinosus* Reich. (Hymenoptera: Formicidae): Biométrie de l'appareil stridulateur et analyse du signal produit. **Insectes Sociaux**. v.23, p.29-48, 1976.
- MARKL, H. Stridulation in leaf cutting ants. **Science**. v.149, p.1392-1393, 1965.
- MARKL H. Die Verständigung durch Stridulationssignale bei Blattschneiderameisen II. Erzeugung und Eigenschaften der Signale. **Zeitschrift für vergleichende Physiologie** v.69, p.6-37, 1968.
- RAVEN PRO. Version 1.4. Bioacoustics Research Program. **Raven Pro: Interaction Sound Analysis software** (Version 1.4) (Computer Software). Ithaca, NY: The Cornell Lab. Of Ornithology. [http:// www.birds.cornell.edu/raven](http://www.birds.cornell.edu/raven), 2011.
- ROCES, F.; TAUTZ, J. Ants are deaf. **Journal of the Acoustical Society of America** v.109, p.3080-3082, 2001.
- ROCES, F.; HÖLLDOBLER, B. Use of stridulation in foraging leaf cutting ants: mechanical support during cutting or short-range recruitment signal? **Behavioral Ecology and Sociobiology** v.39, p.293-299, 1996.
- ROCES, F.; HÖLLDOBLER, B. Vibrational communication between hitchhikers and foragers in leaf cutting ants (*Atta cephalotes*). **Behavioral Ecology and Sociobiology** v.37, p.297-302, 1995.

ROCES, F.; TAUTZ, J.; HÖLLDOBLER, B. Stridulation in leaf cutting ants: short-range recruitment through plant borne vibrations. **Naturwissenschaften** v.80, p.521-524, 1993.

TAUTZ, J.; ROCES, F.; HÖLLDOBLER, B. Use of a sound based vibratome by leaf cutting ants. **Science**. 267: 84-87, 1995.

VIBSOFT 4.7. **Polytec Vibrometer Software**, Polytec GmbH, Waldbronn, 1997-2009.

WILSON, E. O. Caste and Division of Labor in Leaf-Cutter Ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). **Behavioral Ecology and Sociobiology** v.7, p143-156, 1980.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutters ants (Hymenoptera, Formicidae). IV: Colony ontogeny of *Atta cephalotes*. **Behavior Ecology and Sociobiology** v.14, p.55-60, 1983.

ZAMITH, A.P.; MARICONI, F.A.; PAIVA CASTRO, U. Contribuição para o conhecimento da “saúva mata pasto” *Atta bispherica* Forel 1908. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v.18, p.327–338, 1961.



### **3.4 Sinais sonoros das operárias de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) durante o processamento de substrato no fungo simbiote**

#### **Resumo**

A comunicação entre as formigas cortadeiras se dá por meio da interação química e por som, ambas importantes no complexo sistema social destes insetos. Vários estudos já foram feitos sobre a importância da estridulação mediando vários comportamentos, porém, foram realizados para poucas espécies de formigas cortadeiras e em relação ao processamento do substrato nada se tem descrito. Assim, para *A. laevigata*, registrou-se os comportamentos e as vibrações produzidas pelas operárias no material vegetal, no momento do processamento de *Eucalyptus* sp. no fungo simbiote. Observou-se a média da frequência dominante, o número de formigas desempenhando determinada função e a duração de *chirps* envolvidas. A frequência registrada no substrato variou de 400 a 1400 Hz, sendo a média da duração da sequência de pulsos registrada de  $13.37 \pm 0.005$  ms, já a média da frequência principal foi de  $773.86 \pm 157.25$  Hz e de 1 a 27 *chirps* por segundo. Além disso, a média de 3.26 indivíduos foi observada desempenhando determinado comportamento no substrato vegetal, sendo o ato de lambe o mais frequente. Por meio dos oscilogramas foi possível observar que a amplitude dos sinais dos registros dos substratos variou conforme os comportamentos exibidos pelas operárias. A estridulação das operárias durante o processamento do material vegetal permitiu o recrutamento de outros indivíduos para a fonte, pois por mais que o material se fragmentasse, um número constante permaneceu dispondo de atos comportamentais para a incorporação do vegetal no simbiote.

**Palavras chave:** *Atta*, comunicação, som

### 3.4.1. Introdução

A estridulação realizada pelas formigas possui diversas funções, tais como: alarme, recrutamento e a coordenação de atividades no ninho (escavação, mudança de local e forrageamento) (HICKLING e BROWN, 2000; RAUTH e VINSON, 2006; MERCIER et al., 2007; MENZEL e MARQUESS, 2008). Nas espécies inseridas na tribo Attini, ou seja, em formigas cultivadoras de fungo, alguns pesquisadores descreveram este sinal sonoro tendo como função no forrageio e no recrutamento de operárias seja para fontes de substrato vegetal atrativo ou em resposta a sinais de perigo (ROCES et al., 1993; TAUTZ et al., 1995; ROCES e HÖLLDOBLER, 1995; ROCES e HÖLLDOBLER, 1996).

Os sons são produzidos pelo atrito entre as mandíbulas, partes do corpo e ainda por meio de um órgão especializado, denominado órgão estridulador (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; HICKLING e BROWN, 2000; MENZEL e MARQUESS, 2008). Este sinal é detectado pelas operárias por vibrações sonoras propagadas pelo substrato onde se encontram. Aparentemente, elas utilizam as pernas para isso, mas em alguns casos existem pelos modificados que fazem esta captação (ROCES e TAUTZ, 2001). Mas outra hipótese afirma que a captação é feita via área pelas sensilas tricódeas (HICKLING e BROWN, 2000).

De acordo com a hipótese de Roces e Tautz (2001) em curtas distâncias, a estridulação é um mecanismo importante no recrutamento de operárias para o empenho na coleta de um material vegetal adequado. Assim, dependendo da qualidade destas folhas, mais operárias são recrutadas para a fonte por meio da vibração; contudo, este sinal é potencializado quando aliado a feromônios de trilha (HÖLLDOBLER e ROCES, 2001). Outro comportamento observado foi a estridulação em forrageiras no momento em que ajeitam as folhas para retornarem ao ninho com o substrato. Quando isso ocorre, operárias mínimas sobem nestas castas e conseqüentemente uma cede a carona e a outra a protege durante o trajeto de forídeos parasitóides (ROCES e HÖLLDOBLER, 1995).

Assim, já se sabe o papel da estridulação durante o forrageamento do material vegetal. Entretanto, com relação ao preparo do substrato, no fungo simbiote nada se tem descrito. Portanto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a vibração gerada pelos sinais estridulatórios das operárias durante o processamento do material vegetal para a incorporação no simbiote de *Atta laevigata* considerando que a transmissão de informação seja realizada via substrato.

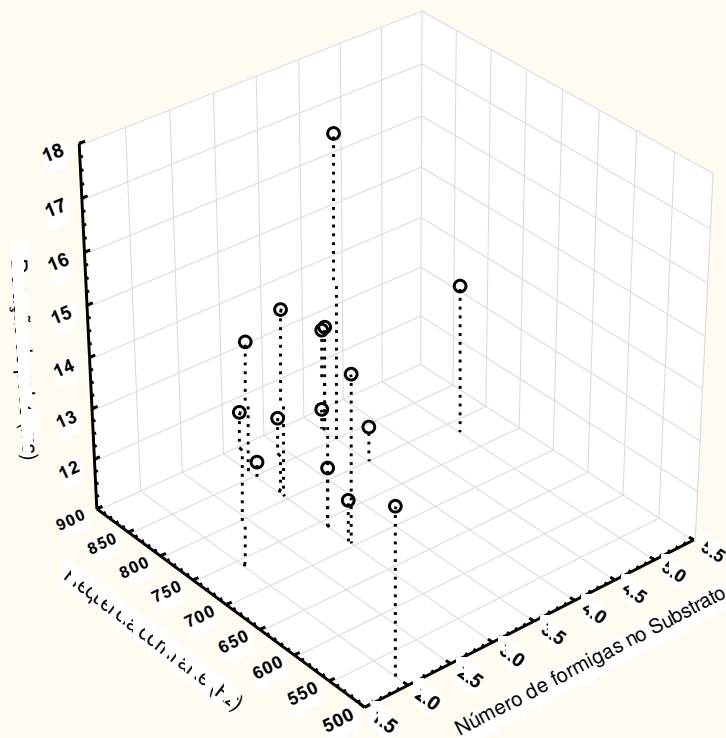
### 3.4.2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro. Para isso utilizou-se uma subcolônia (aproximadamente 0,3 mL de fungo) de *Atta laevigata* disposta em uma caixa de acrílico (30 x 20 cm) transparente. Foi ofertado para as operárias 2 folhas de *Eucalyptus* sp. e foram registradas as vibrações do substrato durante o processamento do vegetal no fungo simbiote a cada 10 minutos. Este acompanhamento foi realizado desde o corte até o início da incorporação do material, também foi quantificado o número de formigas presentes nos substratos analisados e os comportamentos desempenhados por elas. Os comportamentos observados foram de acordo com os descritos por Andrade et al. (2002).

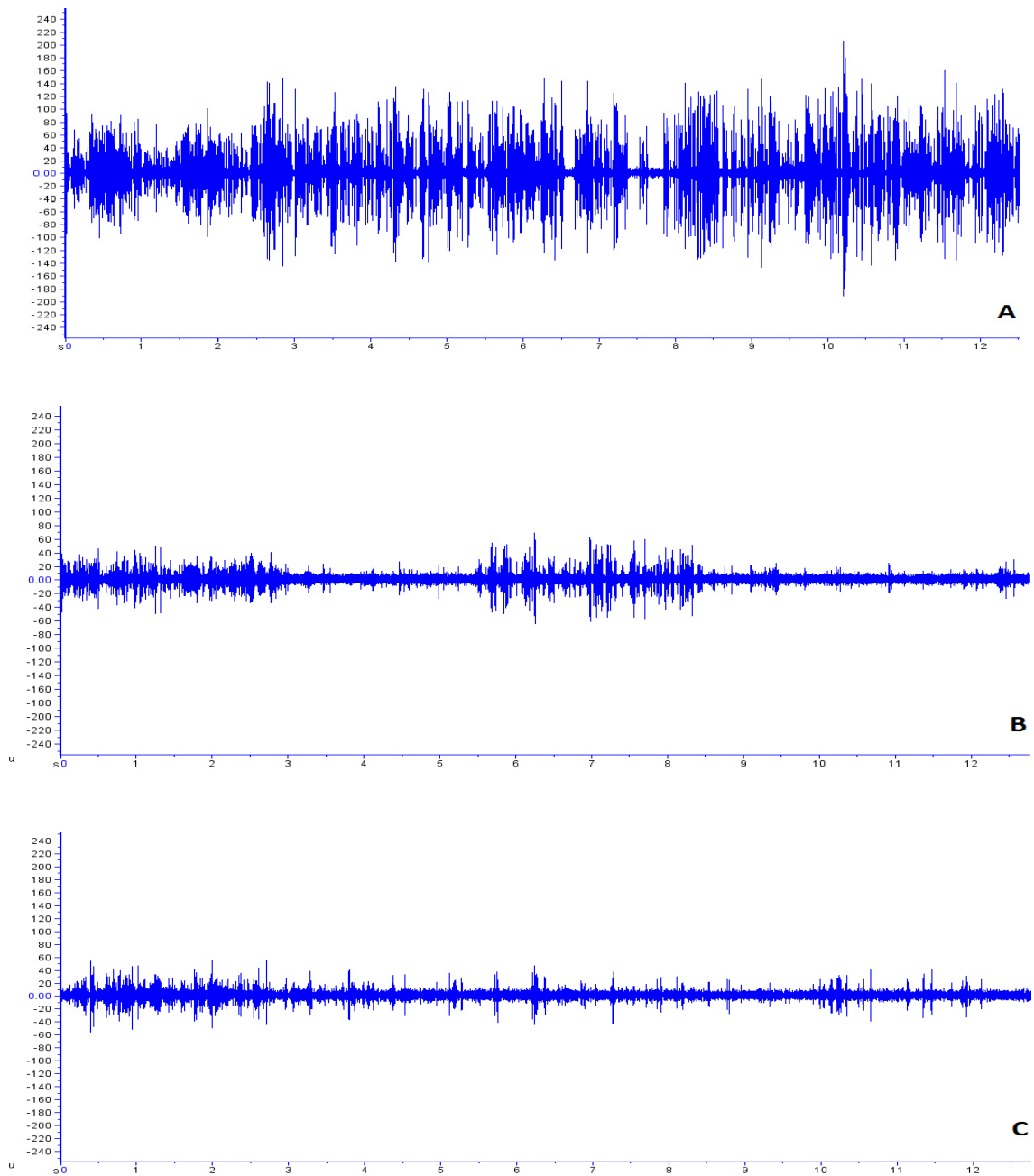
O registro das vibrações sonoras foi realizado com o auxílio de um vibrômetro a laser modelo PDV 100 Polytec que foi apontado para o substrato no decorrer de seu processamento. As observações duraram 5 segundos e os padrões de vibrações foram registrados em pdv, transformados em “sound track” (.wav) e analisados pelo software VibSoft 4.6 e Raven 1.4. Os parâmetros analisados foram: duração de *chirps*, *inter-chirps* e média da frequência dominante.

### 3.4.3. Resultados

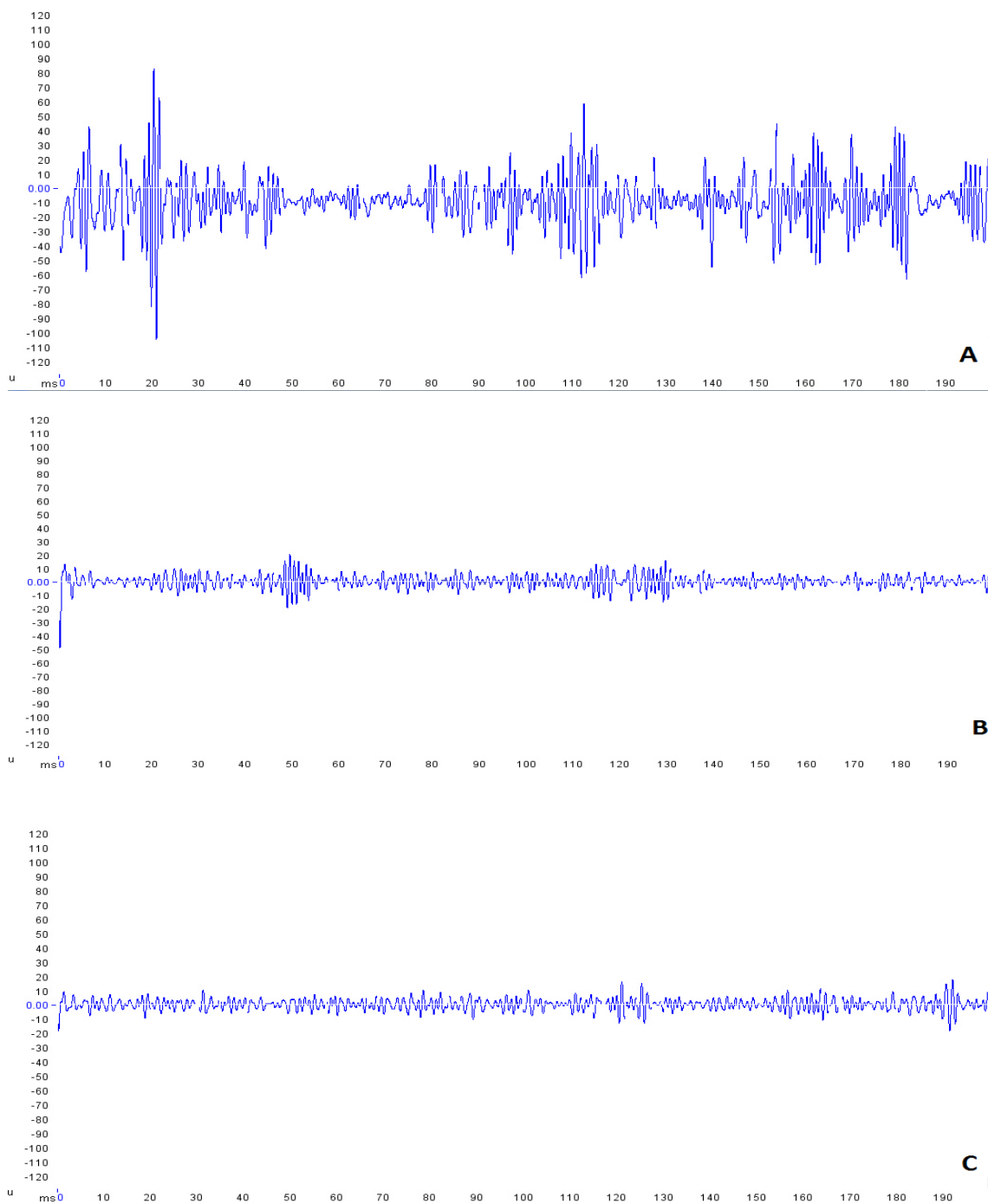
A frequência variou de 516.8 a 866.62 Hz de uma forma geral, não separando por comportamento executado e número de formigas envolvidas, sendo a média da frequência principal de  $773.86 \pm 157.25$  Hz e a média da duração da sequência de pulsos no substrato foi de  $13.37 \pm 0.005$  ms. O experimento durou 2 horas e 20 minutos, sendo as amostras obtidas em intervalos de 10 minutos, totalizando 15 registros de 12.8 segundos (Figura 1 e 2A e B). O comportamento de lambar o substrato foi o mais frequente com maior número de formigas desempenhando esta tarefa, os outros comportamentos descritos foram: cortar a folha, pregar a folha no fungo simbiote, repicar a folha e imobilidade das operárias em cima da folha (Figura 3).



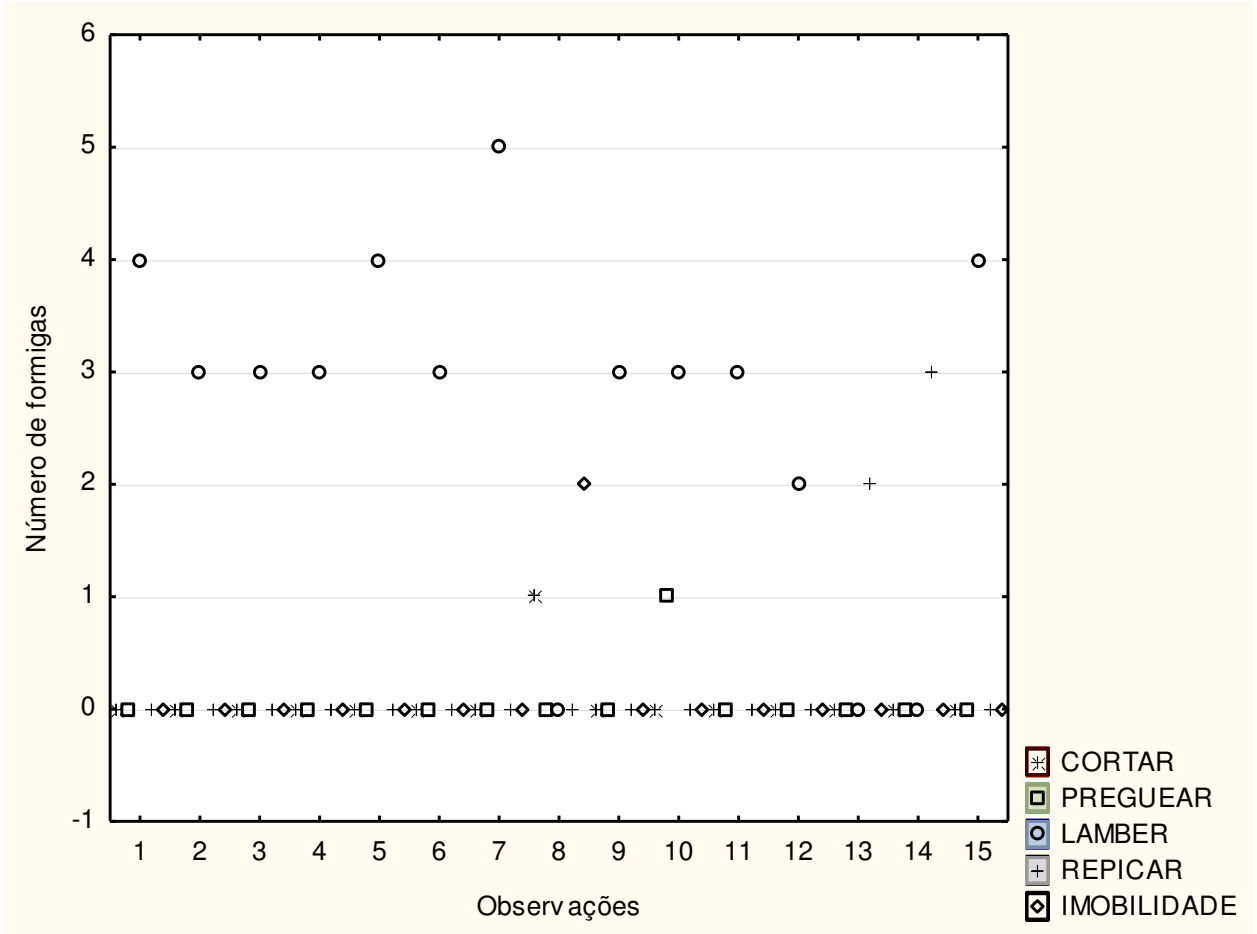
**Figura 1.** Número de operárias de *Atta laevigata* processando *Eucalyptus* sp. para ser incorporado no fungo simbiote e as vibrações detectadas na folha: frequência dominante e duração de *chirps* nas quinze observações.



**Figura 2A.** Oscilograma de um sinal acústico produzido por operárias de *Atta laevigata* registrado na folha de *Eucalyptus* sp. durante o processamento do material vegetal em 12.8 segundos. **A.** vibração no substrato com quatro operárias estridulando enquanto lambem a folha; **B.** vibração no substrato com três operárias estridulando enquanto repicam a folha; **C.** vibração no substrato com 1 operária estridulando enquanto corta a folha.



**Figura 2B.** Oscilograma de um sinal acústico produzido por operárias de *Atta laevigata* registrado na folha de *Eucalyptus* sp. durante o processamento no fungo simbiote em 200 milissegundos. **A.** vibração no substrato com quatro operárias estridulando enquanto lambem a folha; **B.** vibração no substrato com três operárias estridulando enquanto repicam a folha; **C.** vibração no substrato com 1 operária estridulando enquanto corta a folha.



**Figura 3.** Número de operárias de *Atta laevigata* processando duas folhas de *Eucalyptus* sp. no fungo simbiote e os comportamentos registrados.

Na primeira observação com 4 operárias lambendo, as *chirps* variaram de 16 a 21 por segundo, cujo substrato era maior, sendo o número de *chirps* por segundo maior nesta observação quando comparado com os outros registros. Observou-se também uma variação no número de *chirps*/segundos conforme os comportamentos descritos (Tabela 1).

**Tabela 1.** *Chirps* por segundo observados durante a estridulação de *A. laevigata* realizando distintos comportamentos durante o processamento de folhas de *Eucalyptus* sp.

Observações	Chirps/segundo*	Comportamentos/número de operárias
1	16 a 27	Lamber a folha/ 4
2	1 a 22	Lamber a folha/ 3
3	1 a 7	Lamber a folha/ 3
4	6 a 17	Lamber a folha/ 3
5	1 a 17	Lamber a folha/ 3
6	4 a 18	Lamber a folha/ 4
7	1 a 9	Lamber a folha/ 3
8	1 a 18	Cortar a folha/1 e Imobilidade sob a folha/2
9	1 a 7	Lamber a folha/ 3
10	1 a 13	Preguear Folha/1 e Lamber a folha/ 3
11	2 a 9	Lamber a folha/ 3
12	1 a 9	Lamber a folha/ 2
13	4 a 13	Repicar a folha/ 2
14	1 a 3	Repicar a folha/ 3
15	1 a 9	Lamber a folha/ 4

\*Variação no número de *chirps* emitidos durante a vibração do substrato em 12.8 segundos por amostra analisada.



#### 3.4.4. Discussão

O que se pode analisar por meio dos oscilogramas são as distintas vibrações no substrato de acordo com o comportamento executado pelas operárias, observando que as amplitudes são distintas em um dado comportamento (Figuras 2A e B). Apesar de nas observações, verificar o comportamento de pregar, como ele estava sendo executado juntamente com outras operárias que estavam lambendo, não se pode caracterizar um oscilograma em que as operárias estavam apenas pregueando a folha.

No primeiro registro das vibrações no substrato, a duração de *chirps* foi maior que 16.97 ms, com quatro operárias lambendo a folha, no decorrer dos outros registros a duração variou de 11.32 a 14.88 ms, apresentando um padrão constante. Para *Atta colombica* quando as operárias estridulam com movimentos das mandíbulas no solo, elas recrutam outras para a região da escavação (Pielstrom e Roces, 2005). No presente estudo com *A. laevigata* o número de operárias durante o processamento do substrato se manteve praticamente constante ao longo das observações, mesmo quando os fragmentos diminuíram em tamanho. Talvez com a estridulação e o uso desta fonte como recurso alimentar tenha contribuído para este comportamento, contudo, esta é uma hipótese apenas, pois não foram marcadas quais formigas estavam desde o início do processamento e quantas foram recrutadas para dar continuidade, fato este que deve ser esclarecido.

Os sinais vibratórios consistem em uma longa série de pulsos repetitivos denominados de *chirps* e cada pulso é resultante do órgão estridulatório das operárias. Contudo, a comunicação entre elas se dá pela vibração transmitida por meio do substrato, segundo a hipótese de alguns pesquisadores. Roces et al. (1993), em *Atta cephalotes* observou que a taxa de repetição de sinais está entre 2 e 20 *chirps*/segundo, já para *A. laevigata*, os *chirps* variaram de 2 a 21 por segundo. Porém, a via de captação do som deve ser melhor definida; nestes trabalhos é possível afirmar que ocorre a vibração do substrato em consequência da estridulação das formigas, mas será que as formigas captam pelas pernas, via substrato ou pelas antenas, via aérea, ou ainda com ambas as vias e estruturas corpóreas? Mais estudos são necessários para investigar este processo, porém no presente estudo é possível afirmar que no substrato existe um sinal e que este é em uma boa frequência, sendo necessário caracterizar via aérea este sinal para fins comparativos e em uma metodologia que explore esses sinais, isolando o químico que também pode ser efetivo nessa interação.

A estridulação é uma importante ferramenta para as formigas no recrutamento a curtas distâncias, permitindo que novas operárias encontrem a fonte do recurso alimentar e dependendo da qualidade alimentar o número de *chirps* pode aumentar ou diminuir como já descrito por Roces e Hölldobler (1996). Assim, como no processamento do substrato os números de *chirps* emitidos foram maiores no início quando comparadas as outras observações, no entanto as operárias não pararam de estridular e possivelmente foi o que manteve um número constante de formigas durante o processamento. Portanto, pode-se observar que no decorrer do experimento, o número de emissão de *chirps* por segundo diminuíram, quando o substrato já se apresentava fragmentado.

Assim, o presente estudo permite verificar que existe uma variação na emissão de sinais durante o processamento vegetal e são distintos conforme as formigas estridulam e desempenham um ato comportamental enquanto preparam o substrato para ser incorporado em seu simbionte.

### 3.4.5. Referências Bibliográficas

- ANDRADE, A. P. P et al. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology** v.40, p.293-306, 2002.
- HICKLING, R.; BROWN, R.L. Analysis of acoustic communication by ants. **Journal of the Acoustics Society of America**. v.108, p.1920-1929, 2000.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Cambrigde: Havard University Press. p.133-154, 1990.
- MARKL, H. Stridulation in leaf cutting ants. **Science**. v.149, p.1392-1393, 1965.
- MENZEL, T.O.; MARQUESS, J.R. The substrate vibration generating behavior of *Aphaenogaster carolinensis* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal Insect Behaviour**, v.21, n.2, p. 82-88, 2008.
- MERCIER et al. Hammering, mauling, and kissing: stereotyped courtship behavior in *Cardiocondyla* ants. **Insectes Sociaux** v.54, p.403-411, 2007.
- PIELSTROM, S.; ROCES, F. Stridulation in the context of digging behaviour in leaf-cutting ants. :In: **Proceedings of the 3 rd European congress on Social Insects**, St. Petersburg, Russia, 22-27 August, 164p, 2005.
- RAUTH, S.J.; VINSON, S.B. Colony wide behavioral contexts of stridulation in imported fire ants (*Solenopsis invicta* Buren). **Journal of Insect Behavior**. v.19, p.293-304, 2006.
- ROCES, F.; HÖLLDOBLER, B. Use of stridulation in foraging leaf cutting ants: mechanical support during cutting or short-range recruitment signal? **Behavioral Ecology and Sociobiology** v.39, p.293-299, 1996.
- ROCES, F.; HÖLLDOBLER, B. Vibrational communication between hitchhikers and foragers in leaf cutting ants (*Atta cephalotes*). **Behavioral Ecology and Sociobiology** v.37, p.297-302, 1995.

- ROCES, F.; HÖLLDOBLER, H. Both evaluation of resource quality and speed of recruited leaf-cutting ants (*Acromyrmex lundii*) depend on their motivational state. *Behaviour Ecology and Sociobiology* v.33, p.183-189, 1993.
- RAVEN PRO. Version 1.4. Bioacoustics Research Program. **Raven Pro: Interaction Sound Analysis software** (Version 1.4) (Computer Software). Ithaca, NY: The Cornell Lab. Of Ornithology. [http:// www.birds.cornell.edu/raven](http://www.birds.cornell.edu/raven), 2011.
- ROCES, F.; TAUTZ, J. Ants are deaf. *Journal of the Acoustical Society of America* v.109, p.3080-3082, 2001.
- TAUTZ, J.; ROCES, F.; HÖLLDOBLER, B. Use of a sound based vibratome by leaf cutting ants. *Science*. 267: 84-87, 1995.
- VIBSOFT 4.7. **Polytec Vibrometer Software**, Polytec GmbH, Waldbronn, 1997-2009.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A comunicação nos insetos sociais é a essência das interações sociais. As formas de comunicação nas formigas são extremamente variáveis, embora, são consideradas como os insetos das comunicações químicas, outra importante forma é mediada por som produzidos pelo atrito entre as mandíbulas, partes do corpo e ainda por meio de um órgão estridulador destes insetos.

As formigas do gênero *Atta* apresentam uma das sociedades mais complexas que existe, tanto pelo número de indivíduos, como pela existência de um sistema de castas, onde há polimorfismo e polietismo etário. Desta forma, analisar os comportamentos mediados por substâncias químicas, especificamente o reconhecimento entre espécies e sinais sonoros, foi de vital importância para o entendimento dessa sociedade. No presente estudo, observou-se que os sinais químicos e sonoros são importantes para as interações sociais, desempenhando diferentes papéis.

Para fêmeas não fecundadas verificou-se que os sinais químicos são espécie-específicos, porém quanto aos sinais sonoros não existiu especificidade para as espécies comparadas (*Atta sexdens rubropilosa*, *A. capigura*, *A. bisphaerica* e *A. laevigata*). No entanto, entre as castas de uma mesma espécie (*Atta sexdens rubropilosa*) ocorreu um agrupamento das reprodutoras e outro para soldados e forrageiras. Portanto, com base nos experimentos realizados, sugere-se que a estridulação está relacionada com a dinâmica colonial para as tarefas executadas por cada casta e os sinais químicos mediam o reconhecimento entre espécies.

Os sinais químicos também influenciaram no material a ser forrageado, visto que, devido à composição química, as formigas fazem uso ou não de determinada fonte vegetal. Além disso, as operárias dispuseram de mais tempo no processamento da planta mais atrativa para a incorporação no seu simbionte. Mas, sugere-se que neste caso, no comportamento de pós-seleção durante o processamento são mais mediados por sinais sonoros.

Com relação aos sinais sonoros já se sabe que eles mediam o forrageamento a pequenas distâncias, recrutando forrageiras a fontes mais atrativas e notou-se no bioensaio das vibrações produzidas no substrato pela estridulação das operárias que este mecanismo pode ser atuante durante o processamento e incorporação do vegetal no simbionte, interagindo com

companheiras do ninho na execução das tarefas relacionadas aos atos comportamentais para incorporar o substrato vegetal no fungo simbiote.

Portanto, as formas de comunicação em formigas cortadeiras desempenham papéis a priori distintos, mas também podem reforçar um tipo de sinal mediado, e isso é um dos motivos que pode contribuir para o sucesso ecológico atingido por elas.

## **CONCLUSÕES**



- ✚ Os hidrocarbonetos cuticulares são distintos quando comparados entre castas temporárias de *Atta sexdens rubropilosa*, *A. laevigata*, *A. capiguara* e *A. bisphaerica*, sendo um método alternativo para complementar a identificação destas espécies;
  
- ✚ Fragmentos foliares de *Acalypha wilkesiana* e *Virola sebifera* são atrativas para *Atta sexdens rubropilosa*;
  
- ✚ Fragmentos foliares de *Tocoyena formosa* senescentes não foram atrativos para *Atta sexdens rubropilosa*;
  
- ✚ Compostos químicos e ausência de repelentes nos fragmentos foliares de *Acalypha wilkesiana* favoreceram a seleção da mesma por operárias de *Atta sexdens rubropilosa*;
  
- ✚ A ausência de compostos repelentes em folhas de *Virola sebifera* (novas e senescentes), *Schefflera vinosa* (novas e senescentes) e *Tocoyena formosa* (novas), permitiu que as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, fizessem uso destas plantas processando-as e incorporando-as no seu fungo simbiote;
  
- ✚ Os hidrocarbonetos epicuticulares presentes em *Virola sebifera*, *Tocoyena formosa*, *Acalypha wilkesiana* e *Schefflera vinosa* são atrativos para *Atta sexdens rubropilosa*;
  
- ✚ Os tricomas de folhas jovens de *Virola sebifera* são atrativos para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, porém dependendo da quantidade destas estruturas elas podem ser tóxicas;

- ✚ Os tricomas de folhas senescentes de *Virola sebifera* não são atrativos para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*
  
- ✚ A separação de espécies de formigas basais, *Trachymyrmex fuscus* e *Trachymyrmex tucumanus* é possível pelo padrão sonoro, assim como a distinção entre uma espécie mais derivada, *Atta sexdens rubropilosa*;
  
- ✚ Não foi possível distinguir as fêmeas não fecundadas de *Atta sexdens rubropilosa*, *A. laevigata*, *A. capiguara* e *A. bisphaerica* pelo padrão de estridulação;
  
- ✚ O perfil de estridulação de castas reprodutoras é distinto quando comparado com operárias e soldados de *Atta sexdens rubropilosa*;
  
- ✚ Durante o processamento do material vegetal as vibrações das operárias de *Atta laevigata*, diferem conforme o comportamento descrito e este sinal se mantém constante durante todo o processamento do substrato.