
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FRANCIELE GREGO ESTEVES

EXOMETABOLOMA DO TEGUMENTO DA VESPA SOCIAL *Polybia paulista* POR ANÁLISES GC-MS: BASES MOLECULARES DO RECONHECIMENTO DE TIPOS PARENTAIS



**Rio Claro
2014**

FRANCIELE GREGO ESTEVES

EXOMETABOLOMA DO TEGUMENTO DA VESPA SOCIAL *Polybia
paulista* POR ANÁLISES GC-MS: BASES MOLECULARES DO
RECONHECIMENTO DE TIPOS PARENTAIS

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro-SP, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2014

595.798 Esteves, Franciele Grego
E79e Exometaboloma do tegumento da vespa social *Polybia paulista* por análises GC-MS : bases moleculares do reconhecimento de tipos parentais / Franciele Grego Esteves. - Rio Claro, 2015
91 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Mario Sergio Palma

1. Vespa. 2. Cromatografia gasosa. 3. Espectrometria de massas. 4. Metaboloma. I. Título.

*“Feliz o homem que acha a sabedoria
e o homem que adquire conhecimento,
porque melhor é o lucro que ela dá do
que o da prata, e melhor a sua renda do
que o ouro mais fino.”*
Provérbios 3: 13-14

*Dedico esse trabalho á minha família
e aos meus amigos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente por me fortalecer no dia a dia, por me capacitar enfrentar os obstáculos e momentos difíceis da vida e da jornada que escolhi seguir e para a nova a qual Ele me guiará. E por acreditar e confiar que de alguma maneira esta “olhando por mim” me auxiliando a fazer as melhores escolhas para alcançar meus sonhos, objetivos e conquistas.

Agradeço a minha mãe Adriana por sempre estar ao meu lado, pelo exemplo de pessoa de força, caráter, superação e fé, inspiração para meu crescimento e amadurecimento pessoal. Meu pai Cleber, meu irmão Lucas pelo companheirismo, terem paciência e aceitarem as minhas escolhas. Aos meus avós Anabela e Paschoal por confiarem em mim e no meu potencial. Agradeço a todos pelo apoio, amor e carinho enfim tudo que vocês me deram foi fundamental para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Turma Ciências Biológicas Noturno (CBN 2010) palavras não são suficientes para agradecê-los por estes cinco anos juntos. Nos tornamos uma grande família! E quanto aprendizado, quantas experiências acadêmicas e cotidianas divididas, parceria nos estudos e na vida pessoal, trocas de conselhos e desconselhos! Agradeço pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos. Vocês ficarão para sempre em minha memória. Aos meus amigos de Rio Claro, pela amizade e vibrarem comigo a cada conquista e sempre torcerem pelo meu melhor.

Agradeço o meu orientador, Prof. Dr. Mario Sergio Palma, pela oportunidade, ensinamentos, orientação, e pelo exemplo de postura profissional e dedicação à pesquisa. Obrigado por nesses quatro anos ensinar-me o que é a ciência, para onde ela nos leva e quais são as responsabilidades quando decidimos e escolhemos seguir a carreira acadêmica, “um universo” do prazer do conhecimento e aprendizagem, de mais perguntas do que respostas, de desafios e dificuldades, mas também de grandes oportunidades, que para mim até então era desconhecido. Enfim, obrigado pela paciência, e confiança em mim depositada.

Agradeço também ao grupo do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica: Anally, Bibiana (Bibi), Eduardo (Duds), Fernando, José Roberto (Beto), Kenny, Marcel e Nathalia, por toda ajuda direta ou indiretamente concedida. Pela troca de experiências profissionais e conversas não profissionais também. Agradeço em especial ao Fernando, pela ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho, pela paciência e apoio, á Letícia (Muzamba),

Diego (Nega) e Eduardo no auxílio da realização dos bioensaios, e o Beto com acertos finais das referências bibliográficas. Daniel e Nicoli por terem me acompanhado no começo da minha iniciação científica, foram fundamentais nos ensinamentos científicos e convívio de laboratório. A Patrícia que até hoje, mesmo com a distância, trocamos experiências, conversas e risadas.

Agradeço à Universidade pela infraestrutura e pelo apoio acadêmico. Todos os professores que participaram da minha graduação, e que foram responsáveis por me fazer aprender e crescer muito durante todos esses anos.

A FAPESP, pelo suporte financeiro concedido durante o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço especialmente a todas as vespas que foram sacrificadas em prol do conhecimento e desenvolvimento da ciência.

“Assim cada pessoa deixa sua marca em minha vida para sempre, umas porque me ajudam na construção, outras porque me apresentam projetos de sonho e outras ainda porque me desafiam a construí-los” (autor desconhecido modificado por Franciele).

Enfim, á todos o meu MUITO OBRIGADO!

RESUMO

As vespas sociais possuem um eficiente sistema de comunicação química mediada por feromônios, os quais são compostos responsáveis pelas atividades de alarme, recrutamento, defesa da colônia, além do reconhecimento de membros da própria colônia. Esses compostos (em sua maioria são de natureza não polar e volátil) são de maneira geral secretados por diversas glândulas exócrinas, tais como: glândula de veneno, glândula de Dufour, glândula de Richard, glândula de Van der Vecht, entre outras e podem estar aderidos sobre o tegumento das vespas. O tegumento de vespas sociais é recoberto por uma mistura de ceras e hidrocarbonetos epicuticulares, que, em conjunto com uma variedade de outras moléculas, podem desempenhar diferentes papéis na comunicação química destes insetos, um destes papéis e foco deste trabalho é o reconhecimento de indivíduos intraespecífico, mais especificamente o reconhecimento de tipos parentais (indivíduos da mesma colônia). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi identificar quimicamente os compostos de baixas massas moleculares presentes no tegumento da vespa social *Polybia paulista* oriunda de três distintas colônias, através de cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC-MS), com finalidade de caracterizar o perfil químico que constitui o coquetel químico responsável pelo reconhecimento da espécie, bem como dos compostos que permitem a identificação de tipos parentais. Foram encontrados um total de 40 compostos, sendo em sua maioria alcanos saturados e insaturados, e outras moléculas como ácidos, ésteres, cetona e amida. Dentre estes, 32 compostos são comuns às três colônias e aparentemente constituem a base química de reconhecimento da espécie, e ainda os mesmos apresentaram diferenças quantitativas entre as três colônias. Foram encontrados também compostos específicos para cada colônia, que aparentemente constituem a base química de reconhecimento de tipos parentais. Dessa forma, a utilização do sistema analítico de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas mostrou-se eficiente para analisar, caracterizar, identificar, além de diferenciar colônias de uma mesma espécie através da composição química dos compostos de baixa massas moleculares encontrados no tegumento. Estes compostos do tegumento também foram caracterizados funcionalmente através de bioensaios de comportamentos em campo, frente a diferentes estímulos químicos, possibilitando um melhor entendimento da química ecológica destes insetos, através do estudo da comunicação química e dos mecanismos de defesa/reconhecimento de tipos parentais da vespa social *Polybia paulista*.

PALAVRAS CHAVE: Cromatografia Gasosa. Espectrometria de Massas. Tegumento. *Polybia paulista*. Metaboloma.

ABSTRACT

The social wasps have an efficient system of chemical communication by pheromones. Pheromones in social wasps are responsible for inducing activities such as alarm, recruitment, defense colony, beyond recognition of members of the colony itself. These components (mostly are non-polar and volatile) are generally secreted by various exocrine glands, such as venom gland, Dufour gland, Richard gland, Van der Vecht gland, among others. The integument of social wasps is covered by a mixture of waxes and hydrocarbons epicuticular, which together with a variety of other molecules, can play different roles in the chemical communication of these insects, one of those roles and focus of this work is the recognition of individuals intraspecific, more specifically the recognition of parental types (individuals of the same colony). This study aimed to identify the chemical compounds of low molecular masses present in the integument of the social wasp *Polybia paulista* of three distinct colonies, using gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) in order to characterize the chemical profile that constitutes the chemical cocktail responsible for recognition of the species, as well as the compounds that allow the identification of parental types. A total of 40 compounds were found which are mostly saturated and unsaturated alkanes, and other molecules such as acids, esters, ketone and amide. Among these, 32 compounds are common to the three colonies and apparently are the chemical basis for the recognition of the specie, and the same compounds showed quantitative differences among the three colonies. Specific compounds were also found for each colony, which apparently constitute the chemical basis of recognition of parental types. Thus, the analytical system using gas chromatography-mass spectrometry was efficient to analyze, characterize, identify, and distinguish colonies of the same species by the chemical composition of low molecular weight compounds found in the integument. These compounds of the integument were also functionally characterized by behavioral bioassays in the field against different chemical stimuli, allowing a better understanding of the ecological chemistry of these insects through the study of chemical communication and the mechanisms of defense / recognition of parental types of the social wasp *Polybia paulista*.

Keywords: Gas Chromatography. Mass spectrometry. Integument. *Polybia paulista*. Metabolome.

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO8
1.1	Os insetos da ordem Hymenoptera8
1.2	Feromônios e comunicação química9
1.3	Reconhecimento parental11
1.4	Análises de cromatografia gasosa e espectrometria de massas13
2	OBJETIVOS16
3	MATERIAL E MÉTODOS17
3.1	Análise do tegumento a partir do sistema GC-MS17
3.1.1	Tratamento de vidraria e materiais plásticos utilizados nas análises17
3.1.2	Coleta das vespas17
3.1.3	Extração dos compostos de baixas massas moleculares do tegumento17
3.1.4	Derivatização química das amostras18
3.2	Análise de GC-MS das amostras do extrato do tegumento.....18
3.2.1	Análise dos compostos de baixas massas moleculares provenientes do tegumento a partir de GC-MS19
3.3	Biensaio22
3.4	Análise estatística24
4	RESULTADOS25
4.1	Perfil químico qualitativo e semi-quantitativo do extrato do tegumento25
4.2	Código de barras químico34
4.3	Bioensaio36
5	DISCUSSÕES43
6	CONCLUSÃO50
7	REFERÊNCIAS52
8	ANEXOS.....56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os insetos da ordem Hymenoptera

Existem pelo menos 870.000 espécies de Hexapoda descritas, que sem dúvida são o maior táxon dentre os animais. Essa enorme diversidade ocorre principalmente por sua extraordinária adaptação à vida no ambiente terrestre, à capacidade de voo, à coevolução com as plantas que produzem flores, e também à resistência a dessecação e desenvolvimento holometábolos (RUPPERT et al., 2005).

Os hexapodas apresentam grande importância ecológica, médica e econômica. Polinização de muitas espécies de valor econômico para agricultura e exportação de produtos derivados da produção de mel, além de serem predadores naturais de outros insetos, fontes de veneno com valor terapêutico, entre outras características (vespas, abelhas e borboletas), muitos também são vetores de doenças como malária, febre bubônica e tifo (mosquitos, pulgas, piolhos) (FARB, 1973).

Os Hymenoptera provavelmente originaram-se há 300 milhões de anos, durante o final do paleozóico, que marcou o fim da era carbonífera. Durante a era mesozóica, a qual durou 239 milhões de anos, a ordem se diversificou por volta do eoceno (cerca de 60 milhões de anos), onde surgiram os primeiros ancestrais das vespas sociais (CHAUD-NETTO et al., 1994).

Mais recentemente a evolução precoce dos Hymenoptera tem sido avaliada por estudiosos cladistas focados nas relações basais destes insetos. O grupo Hymenoptera compreende formigas, abelhas e uma infinidade de grupos adicionais conhecidos coletivamente como "vespas"; esta é uma ordem de insetos muito diversificada, com cerca de 145.000 espécies conhecidas (VILHELMSSEN, 2010).

As vespas vivem em sociedade, sendo a eussocialidade o principal aspecto desse comportamento, que se caracteriza por: i) divisão reprodutiva de trabalho, no qual indivíduos inférteis fazem o trabalho físico; ii) os indivíduos férteis são incumbidos da reprodução; iii) membros da sociedade cuidam dos juvenis; iv) nenhum indivíduo pode sobreviver independentemente da colônia ou pertencer a uma colônia diferente daquela na qual foi gerado, e se desenvolveu (RUPPERT et al., 2005).

As vespas pertencentes ao grupo dos Hymenoptera Aculeata (com ferrão) estão divididas em três grandes superfamílias: Bethyloidea, Sphecoidea e Vespoidea (BROTHERS,

1975). A família Vespidae é uma subdivisão da superfamília Vespoidea, e apresenta a totalidade dos casos conhecidos de eusociabilidade em vespas, com mais de 800 espécies eusociais, as quais habitam colônias fundadas por apenas uma rainha e predam larvas de Lepidoptera, besouros e outras presas (AKRE, 1982). Essa família de vespas é composta por três subfamílias, Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae, onde a subfamília Polistinae é a única encontrada no Brasil, sendo representada por três tribos: Polistini, Epiponini e Mischocyttarini. A tribo Epiponini é constituída por 23 gêneros e 405 espécies, dentre as quais a espécie *Polybia paulista* está localizada (CHAUD-NETTO et al., 1994).

A vespa social *Polybia paulista*, conhecida popularmente como “paulistinha”, é uma espécie muito agressiva que causa muitos acidentes por ferroadas todos os anos no Estado de São Paulo. Possui hábitos urbanos, os seus ninhos são fixados diretamente ao substrato, sem pedúnculo, e os favos são colocados horizontalmente, um abaixo do outro, com um envelope protetor ovóide circundando-os (RICHARDS, et al., 1951). As fundações de novos ninhos ocorrem o ano todo independente das condições climáticas.

1.2 Feromônios e Comunicação Química

Vespas sociais precisam de um eficiente sistema de comunicação para a coordenação de seus membros e das numerosas atividades da colônia. A este respeito, a comunicação química é a mais utilizada por vespas sociais para transferência de informações intraespecíficas através de feromônios, que são as principais substâncias químicas que medeiam o reconhecimento entre membros da colônia e coordenam o ninho para atividades como: defesa, alarme e recrutamento, além de servir para comunicação interespecífica (BRUSCHINI et al., 2010).

Entre os exemplos mais conhecidos de secreções das glândulas exócrinas estão os feromônios de alarme, feromônios sexuais e feromônios de trilha, notório nas operárias de formigas e térmitas, esses depositam marcadores químicos sobre o substrato para indicar a trajetória para fontes de alimento ou locais de nidificação (VILELA et al., 2008).

Em insetos sociais, a defesa da colônia é um aspecto crítico para a sobrevivência de todos os seus membros (HERMANN; BLUM, 1981; SCHMIDT, 1990). Por esta razão, ocorreu uma forte seleção para uma comunicação rápida e um subsequente recrutamento dos membros de uma colônia contra predadores ou intrusos, levando à evolução dos feromônios de alarme (WYATT, 2003).

Os feromônios de alarme de insetos sociais são, depois dos feromônios sexuais, uma das classes mais comuns de sinais químicos, e esta classe de compostos evoluiu de forma independente em relação às outras moléculas presentes nestes animais (BLUM, 1985).

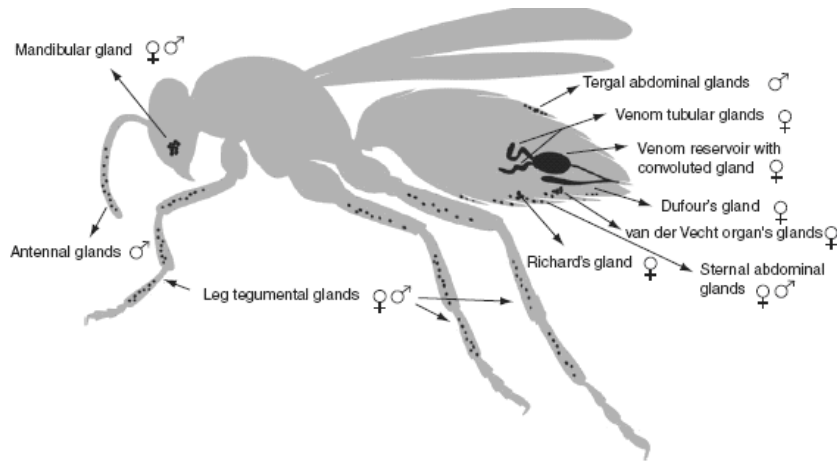
Os ferômonios são os principais responsáveis pela sinalização do comportamento de alarme nas colônias, produzindo respostas rápidas a qualquer perturbação do ninho que exija que seus membros reajam defensivamente (LANDOLT et al., 1998).

Desta forma, os feromônios de alarme são os responsáveis por “avisar” os membros de uma colônia sobre uma ameaça em potencial, com a finalidade de guiar as vespas de uma forma agressiva em direção ao agressor (BRUSCHINI et al., 2010). Portanto estes feromônios são responsáveis por reações estereotipadas entre os insetos (STARR, 1990), pelo recrutamento de operárias, além de uma aceleração dos movimentos de ataque contra potenciais invasores (ALI; MORGAN, 1990).

Em algumas espécies de vespa sociais, uma perturbação externa ao ninho induz a saída de algumas operárias para fora do ninho, que disparam um “spray” de veneno em direção ao intruso. Em algumas espécies de vespas sociais, se a perturbação continua, as operárias voam para longe abandonando a colônia ao invés de tentar ferroar o intruso (STRASSMANN et al., 1990); no entanto, na maioria das espécies de vespas sociais existem componentes voláteis que ocasionam um ataque em massa contra o intruso/predador (MASCHWITZ, 1964).

Em vespas sociais, os feromônios de alarme são compostos voláteis, secretados principalmente pelas glândulas exócrinas associadas ao aparelho de ferrão, esses geralmente são uma mistura de multicomponentes, o que geram um alto potencial de especificidade às mensagens, as quais desempenham funções nas interações comunicativas entre companheiras de ninho (operárias) (Figura 1) (AKRE, 1982; ALI; MORGAN, 1990; BILLEN; MORGAN, 1998).

Figura 1: Desenho esquemático da localização das glândulas exócrinas presentes no corpo de uma vespa social padrão. Locais e escalas são apenas aproximados. Extraído de Bruschini et al., 2010.



1.3 Reconhecimento parental

O reconhecimento de tipos parentais (“companheiros da mesma colônia”) é o processo pelo qual os insetos sociais, como por exemplo, vespas reconhecem indivíduos pertencentes ou não a sua própria colônia, e conseqüentemente permite ou não a entrada destes indivíduos em seu ninho (van ZWEDEN; ETTORÉ, 2010).

O reconhecimento entre membros da colônia é considerado a chave para a inovação na evolução da sociabilidade. Insetos sociais evoluíram um sofisticado sistema de reconhecimento que permite aos indivíduos de uma mesma espécie, distinguir aqueles pertencentes à mesma colônia, daqueles que não fazem parte da mesma. Os sinais utilizados para o reconhecimento de membros de um mesmo ninho são tipicamente hidrocarbonetos presentes no exoesqueleto das operárias. Esses insetos são capazes de realizar discriminações precisas através de apenas uma única varredura da antena no tegumento de outro indivíduo, assim como demonstrado na Figura 2 (van WILGENBURG et al., 2010).

Figura 2: Comportamento de varredura da antena da vespa (*Polistes fuscatus*) “dominante” no tegumento da vespa “subordinada”. Extraído de Eberhard, 1969.



Na literatura é possível encontrar que o comportamento de “grooming” tem grande contribuição na transferência de feromônios entre abelhas. Alguns exemplos de feromônios responsáveis pela inibição de ovários de operárias são produzidos pela glândula mandibular da rainha e esta por “self-grooming”, distribui estes feromônios através de sua boca para outras partes do corpo como antena, abdômen e membros que posteriormente são transferidos para operárias através do contato dessas com a superfície do corpo ou aparato bucal da rainha (TRHLIN and RAJCHARD, 2011).

A superfície do corpo das vespas é coberta por uma fina camada de cêra e de hidrocarbonetos cuticulares (CHCs), que desempenham o papel de reduzir a perda de água interna, e prevenir entrada de patógenos e parasitas. No entanto, esta mistura de ceras epicuticulares também desempenha o papel de comunicação química, funcionando como uma fonte de informação intra/interespecífica (BRUSCHINI et al., 2010).

Esta camada epicuticular composta de lipídios, hidrocarbonetos e ceras é sintetizada por células associadas à epiderme. Contudo, foi demonstrado que a glândula de Dufour também produz uma mistura de hidrocarbonetos e lipídeos, similares aos da mistura epicuticular. Embora, estes resultados sugiram que a glândula de Dufour pode estar envolvida na produção destas moléculas em vespas sociais, é necessário mais investigações para confirmar a contribuição desta glândula para a produção da camada epicuticular. Além disso, os mesmos CHCs encontrados na cutícula e na glândula de Dufour, também são os principais compostos secretados pelas glândulas abdominais esternais (BRUSCHINI et al., 2010).

Pouco antes da ovoposição, a fêmea da vespa *Parischnogaster* dobra seu abdômen e secreta uma substância abdominal (produzida pela glândula de Dufour), que com ajuda das

patas anteriores, leva até a boca formando uma “bola de secreção”. Novamente estende e dobra seu abdômen, depois de poucos segundos ela deposita o ovo sobre a “bola de secreção”, que segura em sua boca. Posteriormente, o ovo é anexado ao fundo da célula produtora, por meio da secreção pegajosa existente na superfície convexa do ovo, enquanto a secreção esbranquiçada permanece em sua superfície côncava, assim a vespa está livre para coletar outra “bola de secreção” que ela depositará no ovo (ROSS; MATTHEWS, 1991).

O perfil de hidrocarbonetos epicuticulares geralmente é específico de cada colônia, sendo que diferentes colônias possuem diferentes concentrações relativas desses compostos. Estudos têm demonstrado que existe uma relação positiva entre o nível de agressividade de diferentes colônias e suas diferenças nos perfis de CHCs (van WILGENBURG et al., 2010).

Em algumas espécies de vespas sociais foi elaborada a hipótese de que a secreção da glândula de Dufour pode ser difundida pela superfície do corpo do inseto durante a auto-limpeza e, dessa forma, torna-se responsável pelo reconhecimento parental (ABDALLA, 2001).

Os insetos sociais não apenas realizam muitas tarefas na colônia, como forrageamento, defesa e construção do ninho, mas também devem responder às condições de mudanças, ajustando o número de operárias que executam cada tarefa. Uma pesquisa feita com operárias de formigas *Pogonomyrmex barbatus*, através de bioensaios realizados a partir do encontro destas formigas com pequenos modelos de formigas (“bonecos”) quimicamente tratados, mostrou que os hidrocarbonetos cuticulares são usados no reconhecimento químico entre essas formigas (GREENE; GORDON, 2003).

Análises do tegumento de diferentes castas do cupim *Zootermopsis nevadensis* feita por cromatografia gasosa e espectrometria de massas, mostraram que todas possuíam os mesmos compostos cuticulares, porém em diferentes proporções entre si. O perfil de hidrocarbonetos encontrados foram principalmente de n-alcenos, n-heicosanos, n-tricosanos, n-pentacosanos (VEERESH et al., 2000).

1.4 Análises de cromatografia e espectrometria de massas

Análises rápidas e em larga escala feitas por técnicas hífenadas tais como GC-MS, LC-MS, LC-RMN revelaram que compostos de baixas massas moleculares, que na realidade são os metabólitos secundários extraídos, principalmente de plantas, fungos e animais. Estes compostos estão sendo alvo crescente de pesquisas no mundo todo e, apesar de ser uma área de pesquisa relativamente nova, existe uma considerável quantidade de literatura a respeito

dessas técnicas analíticas, que podem ser denominadas de diversas formas, dependendo do alvo dos estudos, assim como estudo do perfil (*fingerprinting*) metabólico, “*footprinting*” metabólico, análise metabonômica entre outros (FIEHN, 2002; FIEHN et al., 2000; GLASSBROOKET et al., 2000; SCHAUER et al., 2001).

Os metabólitos constituem um conjunto enorme de arranjos atômicos quando comparados ao proteoma e ao transcriptoma. Isto fornece grandes variações nas propriedades químicas (massa molecular, polaridade, solubilidade) e físicas (volatilidade) dos diferentes metabólitos (DUNN; ELLIS, 2005).

Em um experimento de metaboloma, geralmente, procura-se identificar e quantificar todos os endo/exometabólitos, numa dada condição fisiológica, ou farmacológica, patológica, ou desenvolvimental, num determinado tempo. Uma característica importante dessas análises é que a análise metabolômica não é espécie-específica; portanto, a partir do momento em que se otimizam os parâmetros de análise, esses mesmos parâmetros serão aplicáveis a procariotos, fungos, plantas e animais (HOLLYWOOD et al., 2006).

Considerando-se que a expressão de metabólitos também varia de acordo com as necessidades de um determinado organismo, em relação às condições ambientais e ao período em que esse organismo foi obtido, ou está sendo mantido. Historicamente, a maior parte dos estudos de metabólitos foi realizada utilizando-se da combinação das técnicas de Cromatografia Gasosa Capilar de alta resolução, combinada com Espectrometria de Massas (GC-MS) (WANT et al., 2006).

O sistema de GC-MS é composto de um cromatógrafo a gás, acoplado a um espectrômetro de massas (geralmente com ionização de impacto eletrônico e analisador de massas quadrupolo).

O cromatógrafo gasoso utiliza uma coluna capilar, onde os compostos serão separados a partir de uma mistura complexa, que serão detectados pelo detector de massas, permitindo a identificação de micromoléculas-chave, em biofluidos e provendo diversas informações diagnósticas (SCHAUER et al., 2005; WANT et al, 2006). Sendo o sistema que possui maior sensibilidade e reprodutibilidade para estudos de moléculas de baixas massas moleculares, tanto voláteis e apolares, como não voláteis e polares que, nesse caso, podem ser facilmente derivatizadas.

Além disto, esta é uma das principais ferramentas para o estudo de marcadores moleculares, pois permite a comparação de espectros reais com extensas bibliotecas de espectros de massa de forma muito precisa (MORITZ et al., 2005).

Dessa forma, o estudo de compostos voláteis presentes no tegumento de insetos sociais podem ser analisados com eficiência pelo sistema de GC-MS, gerando informações importantes sobre a comunicação química desses insetos.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como finalidade identificar os compostos de baixas massas moleculares encontrados no tegumento da vespa *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) de três colônias diferentes, através de análises GC-MS (Shimadzu). Além de identificação de compostos foi visada a caracterização do perfil químico que constitui o coquetel químico responsável pelo reconhecimento da espécie, bem como dos compostos que permitem a identificação de tipos parentais, i.e., indivíduos da mesma colônia.

Realizar ensaios biológicos a fim de se testar o possível envolvimento dos compostos encontrados no tegumento da vespa, no reconhecimento de membros de uma mesma colônia, além de se determinar a influência destes compostos químicos na comunicação e na agressividade destes animais. Além de tentar revelar como as vespas sociais alteram seus comportamentos frente a diferentes perfis químicos de seus tegumentos, auxiliando no entendimento da química ecológica da vespa social *Polybia paulista*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise do tegumento a partir do sistema de GC-MS

3.1.1 Tratamento da vidraria e materiais plásticos utilizados nas análises

Tendo em vista a alta sensibilidade do sistema de GC-MS, torna-se necessário livrar a vidraria e demais materiais de contaminantes (por exemplo, plastificantes, desmoldantes, resíduos da fabricação, etc.).

Para o tratamento dos materiais, foi feito uma lavagem com Hexano grau HPLC com 95% de pureza (TEDIA) por 60 minutos, posteriormente em solução de Hidróxido de Sódio 0,5% (m/v) (SYNTH) em água MilliQ (MILLIPORE) por 60 minutos; em seguida, o material foi novamente lavado com Hexano 95% de pureza (TEDIA) por mais 60 minutos. Para eliminar a dúvida sobre possíveis contaminantes, foram realizadas análises GC-MS com os solventes utilizados nas diferentes etapas de lavagens das vidrarias e plásticos.

3.1.2 Coleta das vespas

Três diferentes colônias (ninhas) da vespa *Polybia paulista*, (Hymenoptera, Vespidae) foram selecionadas e coletadas na cidade de Rio Claro/SP, sudeste Brasil. As colônias foram coletadas de forma georreferenciada – Colônia A: 22°23'42.5"S 47°32'33.3"O; Colônia B: 22°23'44.6"S 47°32'53.1"O; Colônia C: 22°23'27.6"S 47°32'41.1"W. As vespas foram imediatamente sacrificadas por congelamento e mantidas em freezer (- 80°C) até o uso.

3.1.3 Extração dos compostos de baixa massa molecular do tegumento

A fim de obter o lavado do tegumento da vespa, três operárias foram mergulhadas em um tubo pré-tratado contendo 300µL Hexano 95% de pureza (TEDIA) por 2 minutos à 28°C. Posteriormente os insetos foram removidos e os extratos foram centrifugados a 650 rcf, durante 5 minutos, a 25 °C; foi então retirado o sobrenadante de cada amostra, que foi seguida da imediata injeção no GC-MS, posteriormente essa mesma amostra foi submetida à

derivatização química (conforme descrito abaixo), para novamente ser analisada. Este procedimento foi realizado para cada colônia (A, B e C) separadamente.

3.1.4 Derivatização química das amostras

Esterificação de ácidos graxos:

Para a esterificação de 1mg do extrato do lavado do tegumento, o mesmo passou por um processo prévio de saponificação em presença de 40 μ L de Hidróxido de Potássio 0,5M (SIGMA ALDRICH) em Metanol anidro; posteriormente acrescentou-se 60 μ L de Metanol anidro (SIGMA ALDRICH). A mistura foi agitada e colocada em banho-maria a 60°C por 15 minutos. Após isso, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente.

Em seguida à saponificação, a amostra foi metilada com Metanol anidro, em presença 40 μ L de Ácido Sulfúrico 1,0M (SIGMA ALDRICH), que diminui o pH da solução para menos de 1,5, promovendo a metilação dos ácidos graxos. Logo após, a amostra foi mantida em banho-maria a 60°C por 15 minutos.

Os ácidos graxos esterificados resultantes foram extraídos com 200 μ L de Hexano grau HPLC (TEDIA). A amostra foi agitada por 5 minutos; houve a formação de duas fases, então se coletou a fração superior (hexano). Este procedimento foi realizado para cada colônia (A, B e C) separadamente.

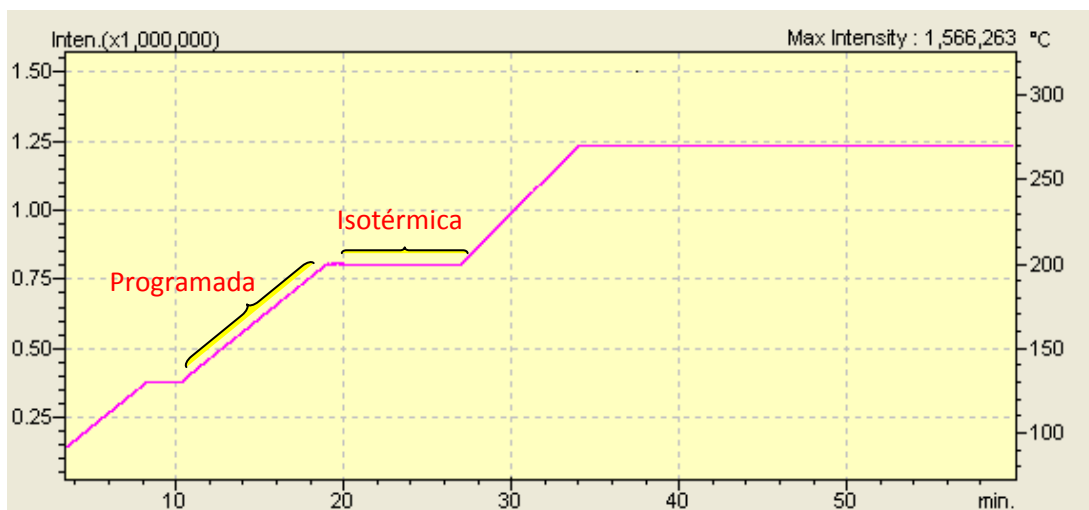
3.2 Análise de GC-MS das amostras do extrato do tegumento

Como equipamento analítico foi utilizado um sistema GC-MS, (SHIMADZU) mod. QP2010 Plus, com detector seletivo de massas. O sistema GC com um controle eletrônico de fluxo (EFC) foi equipado com um *autosampler* (SHIMADZU), AOC 20i e uma porta de injeção “*split/splitless*”.

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de sílica fundida RTx-5MS (5% Fenil- 95% Polidimetilsiloxano; 30m x 0.25mm DI, 0.25 μ m) fornecida pela Restek (Bellefonte, PA, USA). Utilizou-se o gás Hélio (pureza 99.995 %) como carreador, a um fluxo constante de 9mL.min⁻¹.

A temperatura da coluna variou de 80 °C a 270 °C em um gradiente não linear de 60 minutos. O atraso de solvente foi de 5 minutos e o tempo de equilíbrio de 3 minutos (Figura 3).

Figura 3: Método de gradiente não linear de temperatura: a linha em rosa mostra variação da temperatura (programada e isotérmica) no determinado método utilizado para análise da amostra do extrato do tegumento da vespa social *Polybia paulista*.



A porta de injeção foi mantida aquecida a 250 °C e 1µL de volume da amostra injetada no modo “*splitless*” (50s). Os dados foram adquiridos e processados utilizando-se o programa Shimadzu GC Solution. O eluente da coluna de GC foi transferido via uma linha de transferência aquecida a 280 °C e introduzido em uma fonte de ionização por impacto eletrônico (EI) ajustada para 70 eV, também mantida a 280 °C.

3.2.1 Análise dos compostos de baixa massa molecular provenientes do tegumento a partir de GC-MS

Todos os compostos foram inicialmente identificados por comparação com a biblioteca NIST MS 08, 2008 (National Institutes of Standards and Technology Mass spectral). Os hidrocarbonetos, por possuírem uma fragmentação muito similar entre si, independente do tamanho da cadeia, foram comparados com padrões (C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28, C30, C32, C36; (SUPELCO; número de catálogo 50225)), além do uso do cálculo do índice de retenção (conforme descrito abaixo), e posteriormente foi ainda realizada a identificação por simulação da fragmentação de cada pico cromatográfico encontrado na amostra, utilizando-se como ferramenta o programa ChemBioDraw Ultra 12.0 e WindonsChem-MS Calc.

O índice de retenção de um componente é um número, obtido por interpolação, relacionando o tempo de retenção do componente em estudo com o tempo de retenção de dois padrões (geralmente hidrocarbonetos) eluídos antes e após o pico do composto de interesse. Dentre os índices de retenção encontrados na literatura pode-se citar o índice Kováts e o índice de retenção linear (LRI) (VIEGAS; BASSOLI, 2007).

O índice de retenção de Kováts é sempre calculado sob condições isotérmicas de temperatura. O índice de retenção linear é utilizado em temperaturas programadas de coluna, em que um valor similar pode ser calculado utilizando os números extraídos de seus algoritmos, sendo que este valor é chamado de índice de retenção linear – LRI (VIEGAS; BASSOLI, 2007).

O índice de retenção de Kováts é definido como cem vezes um número hipotético, que é igual ao número de átomos de carbono de um alcano saturado de cadeia normal, que tem o mesmo tempo de retenção ajustado que o composto, cujo índice está sendo determinado (SILVA et al., 2005).

O índice de retenção pode ser determinado usando-se um gráfico que relaciona o número de átomos de carbono de alcanos saturados normais com o logaritmo dos tempos de retenção ajustados destes alcanos, ou pelo cálculo aplicando a equação A ou B (Figura 4), o uso destas varia em função da temperatura (isotérmica ou programada, representada na Figura 3) (SILVA et al., 2005).

Para se determinar o índice de retenção de outros compostos em relação a estes padrões (hidrocarbonetos), deve-se a condições experimentais especificadas, tais como, fase estacionária (tipo e espessura do filme) e dados como temperatura (isotérmica ou programada) e outros (SILVA et al., 2005).

Inicialmente, determina-se o índice de retenção de compostos em questão e de alcanos de cadeia normal que sejam eluídos antes e depois do respectivo soluto determinado. Esse sistema é fundamentado na ideia de que a polaridade de uma coluna é dependente não somente da fase estacionária, mas também do tipo de substância analisada. O sistema requer o uso do índice de retenção descrito por Kováts, o qual tem sido muito utilizado para especificar a polaridade de muitas colunas capilares, utilizando-se os polímeros usuais, como polisiloxanos e polietileno glicol (SILVA et al., 2005).

A Figura 5 exemplifica um esquema geral de preparação, análise e interpretação dos resultados obtidos até o presente momento do projeto.

Figura 4: A) representa a equação utilizada para o cálculo do índice de retenção em função da temperatura programada. B) representa a equação utilizada para o cálculo do índice de Kovatz em função da temperatura isotérmica. Em que: I = índice de Kovatz da substância desconhecida, z = diferença entre o n° de carbonos do n-alcano posterior e do anterior, n = número de carbonos do n-alcano anterior, $t_{r(n)}$ = tempo de retenção do n-alcano imediatamente anterior, $t_{r(N)}$ = tempo de retenção do n-alcano posterior, $t_{r(\text{desconhecido})}$ = tempo de retenção do n-alcano desconhecido.

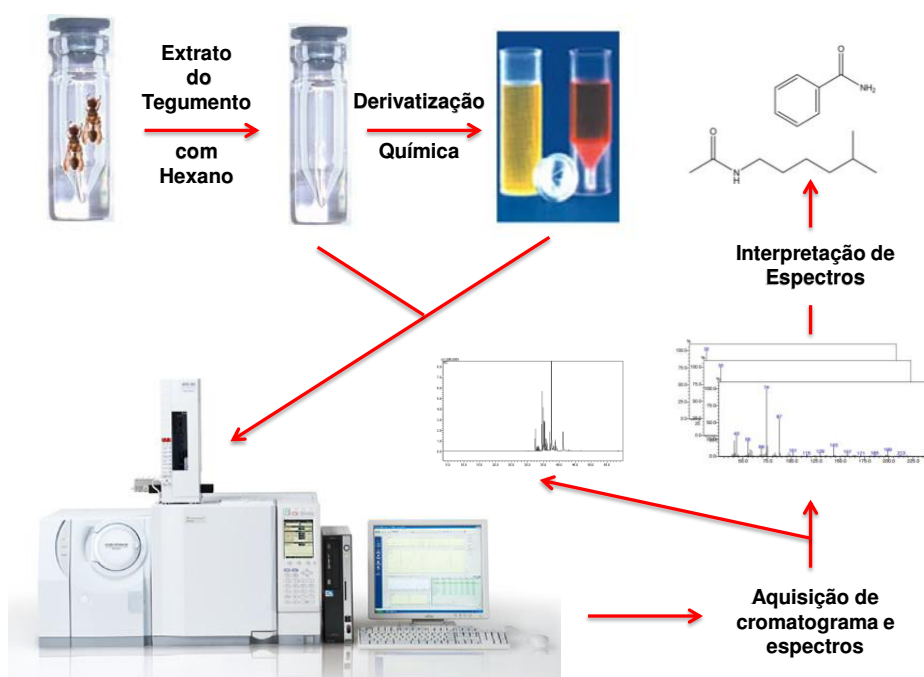
A)

$$I = 100n + 100z \left(\frac{t_r(\text{desconhecido}) - t_r(n)}{t_r(N) - t_r(n)} \right)$$

B)

$$I = 100 [n + (N - n) \left(\frac{\log t_r(\text{desconhecido}) - \log t_r(n)}{\log(N) - \log t_r(n)} \right)]$$

Figura 5: Esquema geral da metodologia em fluxograma. Esse esquema mostra desde a extração dos compostos de baixa massa molecular em Hexano, e posteriormente a extração por derivatização química, análise em cromatografia gasosa acoplada á espectrômetro de massas, aquisição de cromatogramas e interpretação de espectros resultando na identificação dos compostos.



3.3 Bioensaios

A realização de bioensaios foi baseada no protocolo descrito originalmente por Bruschini et al., 2011, com vespas *Polistes dominulus*. Neste presente trabalho, testou-se o possível envolvimento dos compostos encontrados no tegumento da vespa, na comunicação química do reconhecimento de membros de uma mesma colônia (Bioensaio de reconhecimento de tipos parentais da colônia), além de se determinar a influência destes compostos químicos na agressividade destes animais (Bioensaio de reconhecimento de tipos parentais da colônia por intensificação do odor).

3.3.1. Bioensaio de reconhecimento de tipos parentais da colônia

Esse bioensaio foi concebido para verificar o efeito dos compostos encontrados no tegumento da vespa, e possível envolvimento dos mesmos no reconhecimento de membros de uma mesma colônia.

Com auxílio de rede entomológica (puçá) operárias da espécie *Polybia paulista* foram coletadas de três colônias diferentes (denominadas colônia A, B e C). Estas operárias (n=12) foram colocadas em arenas de plástico cilíndricas (8 x 10 cm), e deixadas em aclimação por um período de 60 minutos à 25°C. Após esse período foram realizados três experimentos.

i) Experimento I: uma vespa viva da colônia A (intrusa) foi introduzida na arena com vespas da mesma colônia.

ii) Experimento II: uma vespa viva da colônia B (intrusa) foi introduzida na arena com vespas da colônia A.

iii) Experimento III: uma vespa viva da colônia C (intrusa) foi introduzida na arena com vespas da colônia A.

Esses experimentos foram realizados em triplicata e cada um desses filmados com a câmera (Sony SteadyShot, modelo DSC-W320). Nestes ensaios foram observados alguns comportamentos das operárias, tais como:

- varredura da antena no tegumento de outro indivíduo, seguida de:

i) a aceitação dos “intrusos”, i.e, sem a ocorrência de comportamentos agressivos das operárias em relação aos “intrusos”, indicando o reconhecimento de seu odor, como sendo de indivíduos da mesma colônia;

ii) rejeição dos “intrusos”, i.e, com a ocorrência de mordidas feitas com as mandíbulas, e/ou ferroadas, demonstrando não reconhecimento do odor de indivíduos da mesa colônia.

3.3.2. Bioensaio de reconhecimento de tipos parentais da colônia por intensificação do odor

Esse bioensaio foi concebido para verificar o efeito de um aumento muito grande na concentração dos estímulos químicos, ou seja, aumento da concentração dos compostos químicos oriundos dos tegumentos das vespas, a fim de observar se o aumento da intensificação do odor influencia na comunicação e na agressividade destes animais.

Para isso, preparou-se o extrato bruto das três colônias (A, B e C) separadamente. Assim como descrito na metodologia 3.1.1, porém utilizando-se de 130 operárias, que foram mergulhadas em um tubo pré-tratado contendo 1,5mL de Hexano grau HPLC com 95% de pureza (TEDIA) por 2 minutos à 28°C. Posteriormente os insetos foram removidos e os extratos foram centrifugados a 650 rcf, durante 5 minutos, a 25 °C, e por fim os extratos foram secos com auxílio de uma placa aquecedora a 40°C (CELTAC, DHS16-A).

Com auxílio de rede entomológica (puçá) operárias da espécie *Polybia paulista* foram coletadas de três colônias diferentes (denominadas colônia A, B e C). Essas operárias (n=12) foram colocadas em arenas de plástico cilíndricos (8 x 10 cm), e deixadas em aclimação por um período de 60 minutos à 25°C. Após esse período foram realizados três experimentos.

i) Experimento IV: uma vespa viva da colônia A (intrusa) foi pincelada (“dopada”) com seu próprio extrato, ou seja, com auxílio de um pincel estéril o extrato correspondente á colônia A foi inserido na superfície do abdômen da vespa, a qual logo após, foi introduzida na arena com vespas da mesma colônia.

ii) Experimento V: uma vespa viva da colônia B (intrusa) foi pincelada (“dopada”) com seu próprio extrato, ou seja, com auxílio de um pincel estéril o extrato correspondente á colônia B foi inserido na superfície do abdômen da vespa, a qual logo após, foi introduzida na arena com vespas da colônia A.

iii) Experimento VI: uma vespa viva da colônia C (intrusa) foi pincelada (“dopada”) com seu próprio extrato, ou seja, com auxílio de um pincel estéril o extrato correspondente á colônia C foi inserido na superfície do abdômen da vespa, a qual logo após, foi introduzida na arena com vespas da colônia A.

Esses experimentos foram realizados em triplicata e cada um desses filmados com a câmera (Sony SteadyShot, modelo DSC-W320); os vídeos obtidos foram posteriormente analisados, sendo observados alguns comportamentos das operárias, tais como:

- varredura da antena no tegumento de outro indivíduo, seguida de:

i) a aceitação dos “intrusos”, i.e, sem a ocorrência de comportamentos agressivos das operárias em relação aos “intrusos”, indicando o reconhecimento de seu odor, como sendo de indivíduos da mesma colônia;

ii) rejeição dos “intrusos”, i.e, com a ocorrência de mordidas feitas com as mandíbulas, e/ou ferroadas, demonstrando não reconhecimento do odor de indivíduos da mesma colônia.

Sendo assim, este bioensaio foi realizado a fim de observar e analisar o possível aumento em número de características comportamentais de rejeição (mordidas e ferroadas) em relação ao bioensaio anterior, frente à intensificação do odor característico da vespa intrusa, através da inserção do extrato bruto correspondente no abdômen da mesma.

3.4 Análise Estatística

Posteriormente, os dados comportamentais foram analisados através da contagem de ferroadas e/ou mordidas, observadas nos vídeos em cada um dos experimentos. A contagem foi realizada durante três minutos após a primeira tentativa de ferroada e/ou mordida das operárias presentes na arena, em relação à “intrusa”.

Foi também realizada a análise estatística de variância através do teste ANOVA I (BUSSAB, 2002). Para a execução deste teste foi utilizado o programa de estatística Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007), o qual, a partir de uma probabilidade de erro ($p \leq 0,05$), validou as diferenças entre os grupos experimentais e controle.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil químico qualitativo e semi-quantitativo dos compostos de baixa massa molecular do extrato do tegumento

Como mencionado anteriormente na sessão materiais e métodos, foram selecionadas três colônias (ninhos) diferentes da vespa *Polybia paulista*, denominadas como Colônia A, B e C (Figura 6). De cada colônia foram feitos dois tipos de análise em triplicata: Extrato hexânico (lavado do tegumento em Hexano) e extrato derivatizado (extrato hexânico do tegumento metilado, ou seja, ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos através da reação de esterificação, descrito na metodologia 3.1.4).

Após análises GC-MS do extrato hexânico e também extrato derivatizado, do tegumento das vespas, das colônias A, B e C, obteve-se cromatogramas de íons totais (TIC) para cada uma das amostras. As Figuras 7 e 8 mostram cromatogramas representativos destas análises; por razões de diminuição do tamanho do trabalho de conclusão de curso optamos por apresentar apenas um cromatograma típico de cada tipo de extrato, i.e., um perfil do extrato hexânico e um perfil do extrato derivatizado (ver anexo II).

Figura 6: A: Ninho denominado como colônia A; B: Ninho denominado como colônia B; C: Ninho denominado como colônia C.

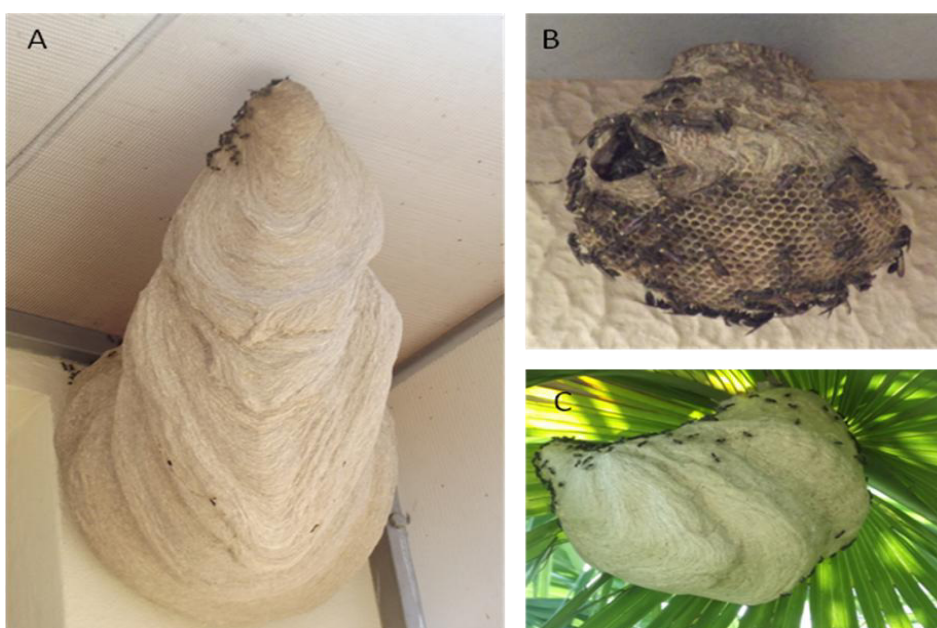


Figura 7: Cromatograma de íons totais (TIC), o qual apresenta o somatório da intensidade de sinais de íons em cada um dos espectros de massas de uma série adquirida em função do tempo de retenção em minutos. TIC representativo do extrato hexânico (A) e derivatizado (B) do tegumento da vespa *Polybia paulista*, colônia C.

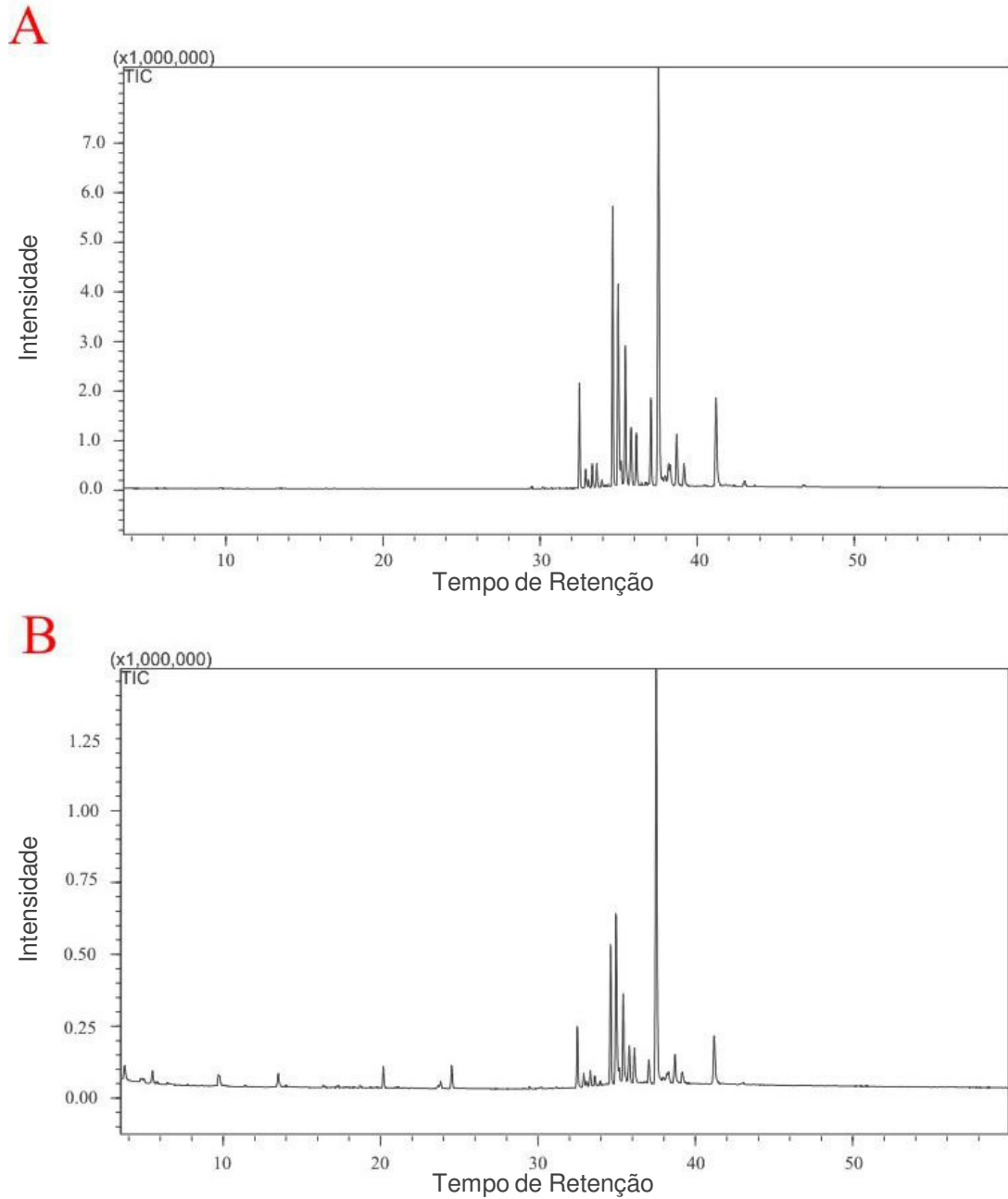
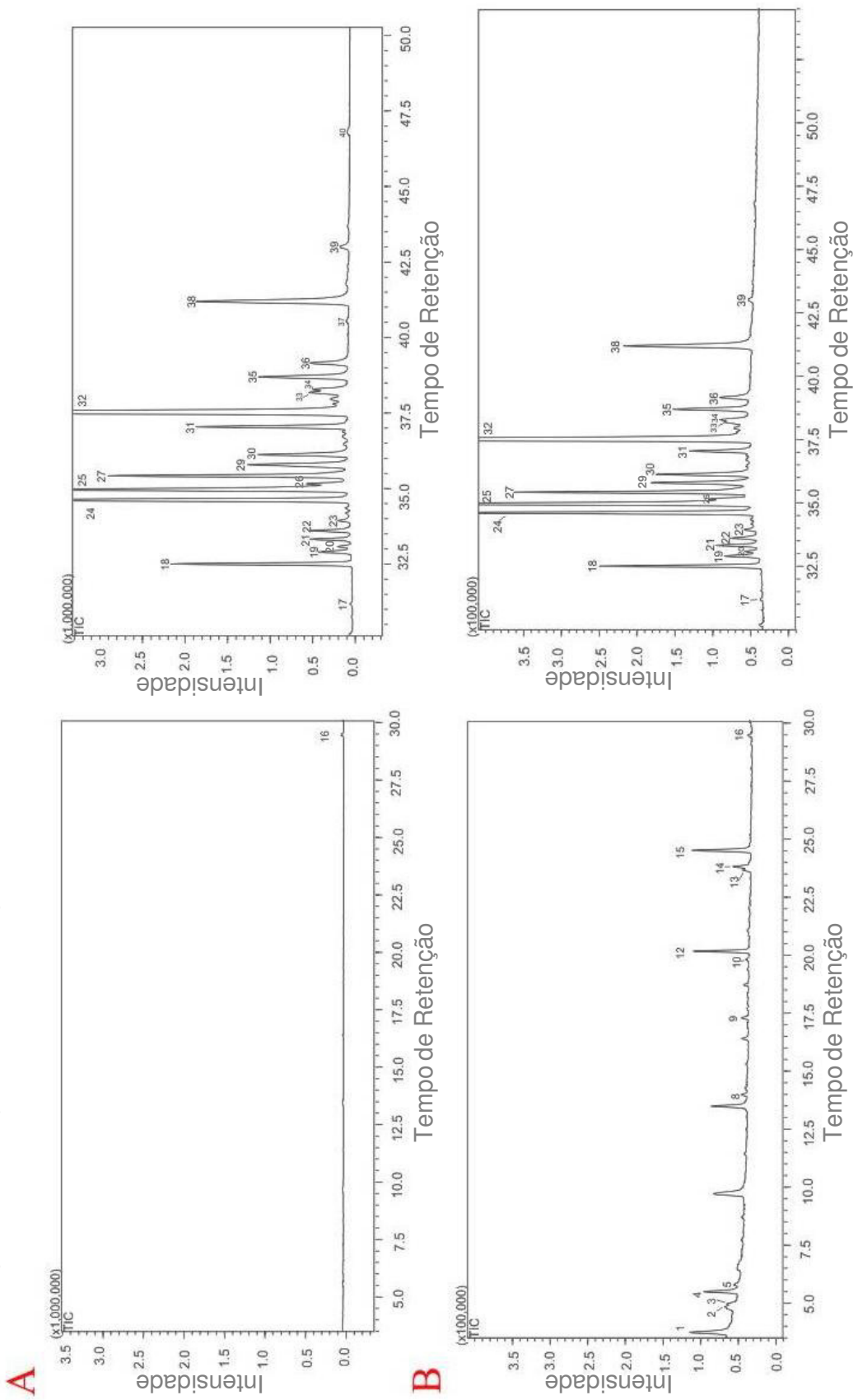


Figura 8: Cromatograma de íons totais representativo do extrato hexânico(A) e extrato derivatizado (B) do tegumento da vespa *Polybia parvula*, colônia C, com picos cromatográficos numerados segundo sua identificação na tabela 1. 1:decano, 2: 2-metilnonan-5-ona, 3: 3-metildecano, 4: undecano, 9: ácido tetradecanoico, 10: ácido 9-hexadecenoico, 12: ácido hexadecanoico, 13: 4-metilnonadecano, 14: ácido 11-ocatenoico, 15: ácido octadecenoico, 16: ácido 11-ocatenoico, 17: tetracosano, 18: pentacosano, 19: 11-metiltetracosano, 20: 2,19-dimetiltricosano, 21: 3-metilpentacosano, 22: hexacosano, 23: 13-metilhexacosano, 24: heptacosano, 25: 2-metilheptacosano, 26: 5,22-dimetilhexacosano, 27: 3-metilheptacosano, 29: 10,11-dimetilheptacosano, 30: 10,14-dimetilheptacosano, 31: nonacosano, 32: 13,14-dimetilheptacosano, 33: 3,10-dimetilheptacosano, 34: 4-metilnonacosano, 35: 13-metilnonacosano, 36: 14-metilnonacosano, 37: hentriacontano, 38: 15-metilhentriacontano, 39: dotriacontano.



E a partir desses cromatogramas e dos espectros de massas de cada composto eluído neste procedimento, foi possível obter informações dos compostos encontrados, como tempo de retenção, área absoluta e área relativa do pico cromatográfico, identificação (segundo a biblioteca NIST MS 08) e a porcentagem de similaridade em que o composto encontrado tem em relação aos compostos padrões da biblioteca, diante disso foi feita a Tabela 1.

As áreas relativas foram determinadas utilizando-se a normalização de das áreas individuais de cada composto baseada na razão entre estas e a área do composto 13,14-dimetiloctacosano (o pico cromatográfico 32) mais intenso encontrado no cromatograma); por isso foi considerado como “pico de referência”.

Para a identificação também foi calculado o índice de retenção de cada pico cromatográfico encontrado na amostra, e esses índices resultantes foram comparados com índices de retenção dos compostos padrões da biblioteca NIST MS 08 fornecidos pela mesma. Foram comparados também com banco de dados on-line Pherobase (feromônios de insetos e semioquímicos - [<http://www.pherobase.com/>]). E por fim com uma lista em ordem alfabética de compostos, com tempo de retenção e índice de retenção aritmética da coluna DB-5 conforme descrito por Adams (2007), com base nessas informações foi construída uma tabela que se encontra no anexo I.

Além da comparação dos índices de retenção também foi realizada a comparação dos espectros reais de cada pico cromatográfico da amostra com espectros obtidos da biblioteca NIST MS 08 e pelo banco de dados on-line Pherobase. Outrossim, foi simulada a fragmentação dos hidrocarbonetos ramificados da amostra (anexo III), utilizando-se como ferramenta o programa ChemBioDraw Ultra 12.0 e WindowChem-MS Calc.

Tabela 1: Tabela dos picos cromatográficos obtidos através da análise por GC-MS do extrato hexânico e derivatizado do tegumento das vespas *Polybia paulista* das três colônias A, B e C. A tabela apresenta o tempo de retenção, relação massa carga, área absoluta, área relativa e os nomes dos compostos identificados.

Pico	Tempo de Retenção(min)	m/z	Nome	Colônia A		Colônia B		Colônia C	
				Área Absoluta	Área Relativa	Área Absoluta	Área Relativa	Área Absoluta	Área Relativa
Pico1	3,745	142	Decano	340603	1,77	379998	1,82	355224	1,2
Pico2	4,853	156	2-metilnonan-5-ona	20311	0,11	31747	0,15	92035	0,3
Pico3	4,984	156	3-metildecano	29050	0,15	51788	0,25	59735	0,2
Pico4	5,507	156	Undecano	221712	1,15	265174	1,27	268786	0,9
Pico5	5,610	156	Ácido (E)-7-oxooct-3-enóico	0	0	0	0	32381	0,1
Pico6	6,123	157	N-(5-metilhexil)acetamida	94397	0,49	0	0	0	0
Pico7	6,311	184	(E)-propil oct-5-enoato	168813	0,88	0	0	0	0
Pico8	13,969	200	Ácido dodecanóico	0	0	0	0	37350	0,1
Pico9	17,3	228	Ácido tetradecanóico	51582	0,27	36197	0,17	46247	0,2
Pico10	19,834	254	Ácido 9-hexadecenóico	21745	0,11	39867	0,19	13789	0,05
Pico11	19,965	254	Octil 2-(tiofenil-2-il)acetato	0	0	13473	0,06	0	0,0
Pico12	20,189	256	Ácido hexadecanóico	175018	0,91	218385	1,05	296071	1,0
Pico13	23,745	282	4-metilnonadecano	180381	0,94	17467	0,08	66179	0,2
Pico14	23,836	282	Ácido 11-ocatecenóico	71217	0,37	113496	0,54	139032	0,5
Pico15	24,55	284	Ácido octadecenóico	136896	0,71	129633	0,62	655332	2,2
Pico16	29,497	324	Tricosano	288598	1,50	40620	0,20	50470	0,2
Pico17	31,202	338	Tetracosano	7342	0,04	50578	0,24	20973	0,1
Pico18	32,518	352	Pentacosano	168527	0,87	459779	2,21	684367	2,3
Pico19	32,918	352	11-metiltetracosano	104183	0,54	204322	0,98	284094	1,0
Pico20	33,099	352	2,19-dimetiltricosano	47995	0,25	100097	0,48	132793	0,4
Pico21	33,336	366	3-metilpentacosano	108831	0,56	176893	0,85	312920	1,1
Pico22	33,625	366	Hexacosano	93320	0,48	187872	0,90	202399	0,7
Pico23	33,964	380	13-metilhexacosano	89004	0,46	123836	0,59	177619	0,6
Pico24	34,625	380	Heptacosano	1998398	10,37	3563768	17,11	2112823	7,1
Pico25	34,979	394	2-metilheptacosano	2581855	13,39	2617368	12,57	4521725	15,3
Pico26	35,173	394	5,22-dimetilhexacosano	307381	1,59	325074	1,56	522580	1,8
Pico27	35,438	394	3-metilheptacosano	1241185	6,44	1528256	7,34	2188163	7,4
Pico28	35,717	394	Octacosano	498800	2,59	0	0	0	0,0
Pico29	35,810	408	10,11-dimetilheptacosano	495607	2,57	687998	3,30	938654	3,2
Pico30	36,145	408	10,14-dimetilheptacosano	529803	2,75	598705	2,87	962574	3,3
Pico31	37,069	408	Nonacosano	745748	3,87	1179264	5,66	506562	1,7
Pico32	37,528	422	13,14-dimetiloctacosano	6807702	35,31	6354008	30,51	10187817	34,4
Pico33	38,210	422	3,10-dimetiloctacosano	174613	0,91	144472	0,69	199899	0,7
Pico34	38,300	422	4-metilnonacosano	102976	0,53	101269	0,49	218470	0,7
Pico35	38,726	422	13-metilnonacosano	345258	1,79	303314	1,46	714427	2,4
Pico36	39,18	436	14-metiltriacontano	198646	1,03	123223	0,59	376505	1,3
Pico37	40,592	436	Hentriacontano	42477	0,22	30558	0,15	164674	0,6
Pico38	41,225	450	15-metilhentriacontano	789609	4,10	604585	2,90	1726851	5,8
Pico39	43,073	450	Dotriacontano	0	0	22243	0,11	53332	0,2
Pico40	46,817	478	15,16-dimetildotriacontano	0	0	0	0	254803	0,9

Como resultado das análises de ambos os tipos de extratos de tegumentos de insetos da colônia A, foram identificados ao todo 35 compostos, sendo que 14% desses compostos são ácidos graxos, 77% são hidrocarbonetos (sendo 31% hidrocarbonetos saturados lineares e 46% hidrocarbonetos saturados ramificados); além destes compostos, também foram identificados 3% de ésteres, 3% de amidas e 3% de cetonas (Figura 9.A)

Da mesma maneira discutida acima, na colônia B foram identificados ao todo 34 compostos, sendo que 15% desses compostos são ácidos graxos, 79% são hidrocarbonetos (sendo 32% são hidrocarbonetos saturados lineares e 47% hidrocarbonetos saturados ramificados); 3% correspondem a ésteres e 3% de cetonas (Figura 9.B).

Na colônia C foram identificados ao todo 36 compostos, sendo que 19% desses compostos são ácidos graxos, 78% são hidrocarbonetos (sendo 31% são hidrocarbonetos saturados lineares e 47% hidrocarbonetos saturados ramificados); além destes compostos, também foram identificados 3% cetonas (Figura 9.C).

Dentre os hidrocarbonetos encontrados nas três colônias a maioria são alcanos saturados ramificados (ramificação metil e etil). Os restantes compostos não representados na tabela, correspondem a resíduos industriais da matriz da fase sólida da coluna.

A figura 10 é uma representação dos dados obtidos na forma de “*heatmap*”. Nesse tipo de representação estão sendo mostrados os compostos de massa molecular detectados e identificados, utilizando-se as concentrações relativas destes compostos calculadas a partir do cromatograma de íons totais (TIC) do extrato do tegumento das colônias A, B e C. As cores “mais quentes” (mais avermelhadas) representam simbolicamente maiores concentrações relativas, enquanto que as cores “mais frias” (mais azuladas), representam as menores concentrações relativas. A ausência de um composto é representada pela cor preta.

Figura 9: Distribuição percentual dos compostos de baixa massa molecular encontrados nos extratos do tegumento da vespa *Polybia patdistica* nas três diferentes colônias estudadas, de acordo com suas funções orgânicas. **A:** Colônia A; **B:** Colônia B; **C:** Colônia C.

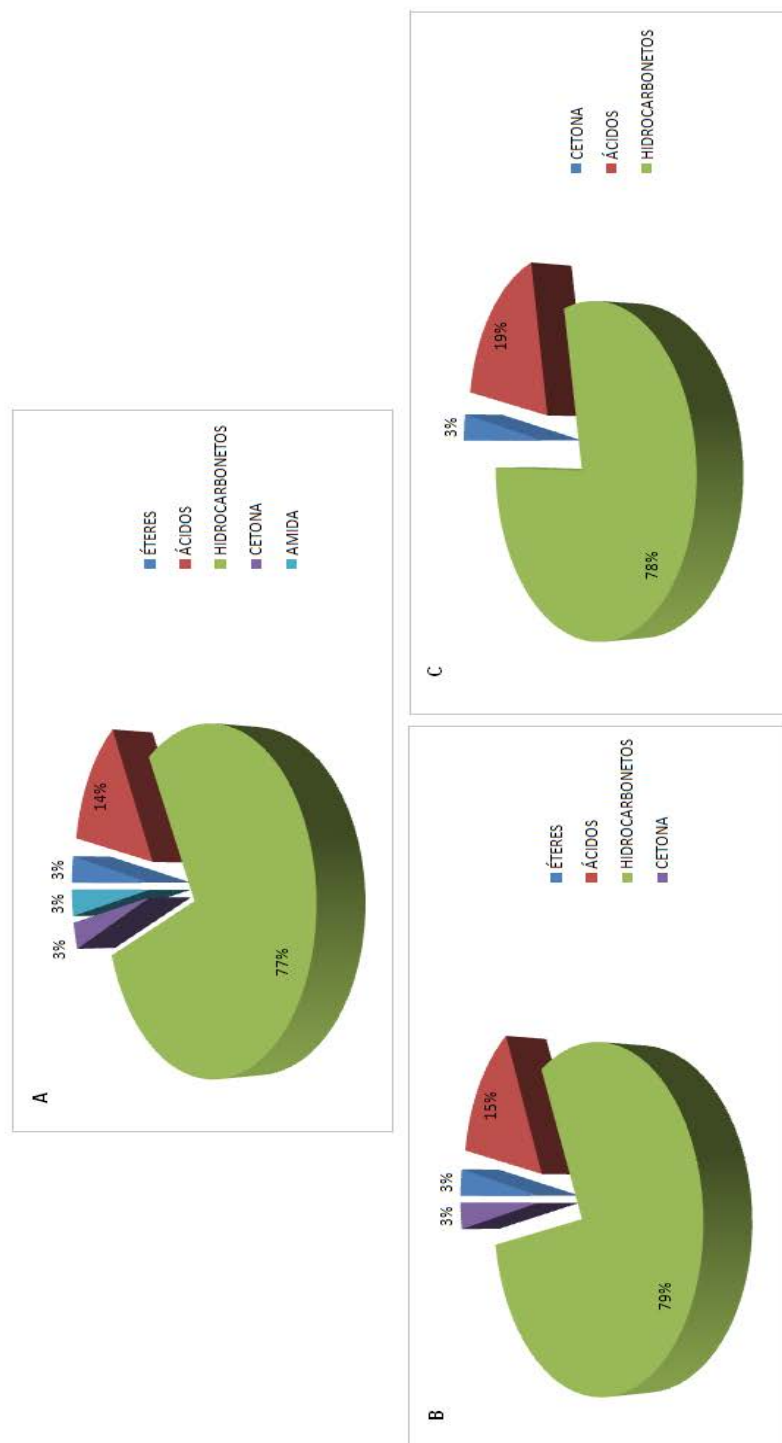
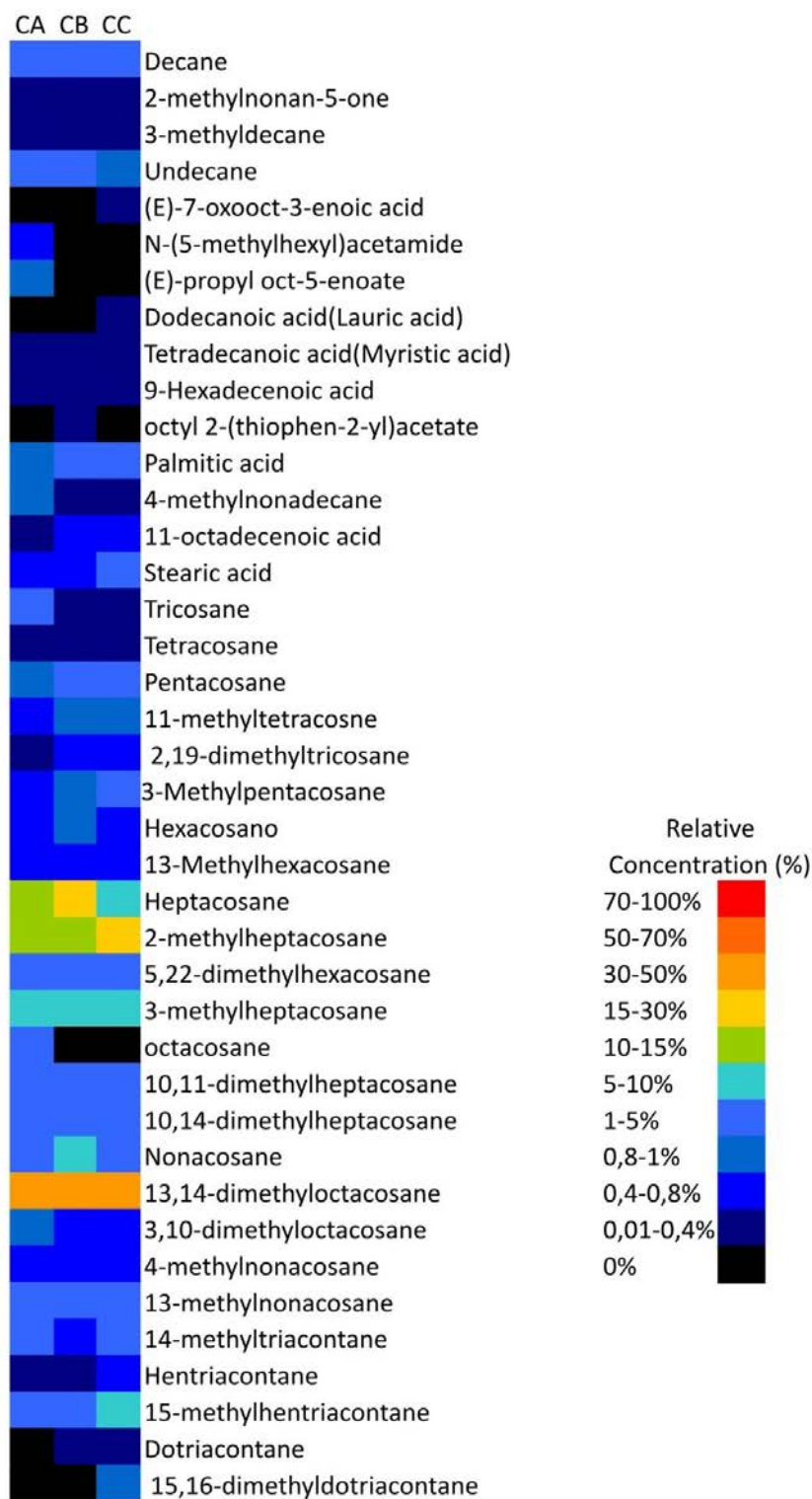
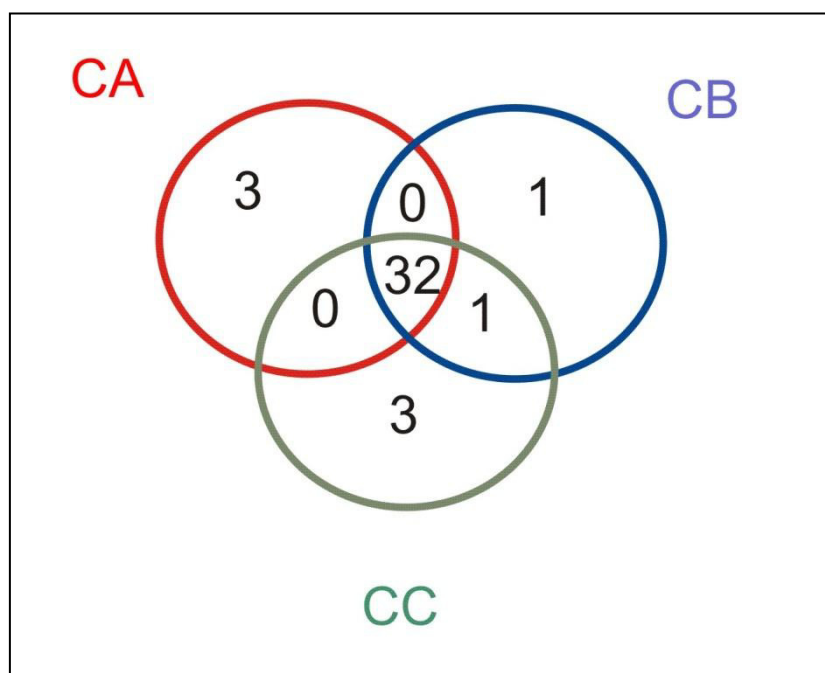


Figura 10: Representação no formato “Heatmap” dos compostos de baixa massa molecular do extrato do tegumento da vespa social *Polybia paulista* encontrado nas três diferentes colônias (Colônia A (CA), Colônia B (CB) e Colônia C (CC)).



Também foi elaborado um diagrama de *Venn* para os compostos de baixa massa molecular encontrados nas três diferentes colônias (Figura 11).

Figura 11: Diagrama de *Venn*, representando o compartilhamento de compostos comuns entre as três colônias sob investigação: **CA:** Colônia A, círculo vermelho; **CB:** Colônia B, círculo azul; **CC:** Colônia C, círculo verde.



Através da análise do diagrama de *Venn* podemos retirar algumas informações: a intersecção entre as três colônias (conjuntos) $CA \cap CB \cap CC$, revelam que a maior parte dos compostos identificados (32) são comuns entre elas, os quais são: decano; 2-metilnonan-5-ona; 3-metildecano; undecano; ácido tetradecanóico (ácido mirístico); ácido 9-hexadecenóico; ácido hexadecanóico (ácido palmítico); 4-metilnonadecano; ácido 11-ocatecenóico; ácido octadecenóico (ácido esteárico); tricosano; tetracosano; pentacosano; 11-metiltetracosano; 2,19-dimetiltricosano; 3-metilpentacosano; hexacosano; 13-metilhexacosano; heptacosano; 2-metilheptacosano; 5,22-dimetilhexacosano; 3-metilheptacosano; 10,11-dimetilheptacosano; 10,14-dimetilheptacosano; nonacosano; 13,14-dimetiloctacosano; 3,10-dimetiloctacosano; 4-metilnonacosano; 13-metilnonacosano; 14-metiltriacontano; hentriacontano; 15-metilhentriacontano e dotriacontano, os quais respectivamente correspondem aos picos cromatográficos 1, 2, 3, 4, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 e 39 encontrados na Tabela 1.

Elementos que se encontram em $CA-(CB \cup CC)$, revelam que existe três compostos que são específicos da colônia A, os quais são: N-(5-metilhexil)acetamida; (E)-propil oct-5-enoato e octacosano, que correspondem respectivamente aos picos cromatográficos 6, 7 e 28 encontrados na Tabela 1.

Assim como $CB-(CA \cup CC)$, revela a presença de um composto específico da colônia B, octil 2-(tiofenil-2-il)acetato que corresponde ao pico cromatografico 11 da Tabela 1. $CC-(CA \cup CB)$, revela a existência de três compostos específicos para a colônia C, os quais são: ácido (E)-7-oxooct-3-enóico; ácido dodecanóico (ácido láurico) e 15,16-dimetildotriacontano, que correspondem respectivamente aos picos cromatográficos 5, 8 e 40 encontrados na Tabela 1. E por fim $(CB \cap CC)-CA$ revela que existe apenas um só composto comum entre as colônias B e C, mas que não é encontrado na colônia A, dodriacontane, que corresponde ao pico cromatográfico 39 da Tabela 1.

4.2 Código de barras químico

A diversidade da vida justifica todos os estudos biológicos, mas também é um grande desafio, pois confronta um planeta constituído por milhões de espécies. Uma vez que poucos taxonomistas podem operacionalmente identificar cerca de 0.01%, das 10-15 milhões de espécies que habitam o nosso planeta, seriam necessários cerca de 150.000 taxonomistas para identificar vida caso fossem mantidas as nossas esperanças no diagnóstico morfológico que apresenta limitações muito significativas (KLACZKO, 2003).

Encontra-se na literatura código de barras para diferenciar espécies, como por exemplo, identificação microgenômica, através do “DNA Barcoding”, este sistema de identificação realiza a discriminação de todas as espécies vivas do planeta através da utilização de um pequeno segmento padronizado de DNA, que podem ser vistas como um “código de barras”. Este sistema tem se mostrado uma estratégia extremamente promissora para o diagnóstico da biodiversidade (HEBERT, 2003). O código de barras de DNA é análogo ao código numérico, à sequência de nucleótidos de um gene comum serviria como um identificador único para cada espécie (POWERS, 2004).

Inspirado nesta abordagem utilizada pela biologia molecular, como ferramenta taxonômica auxiliar, propusemos uma adaptação do uso deste tipo de código de barras às análises de feromônios envolvidos na comunicação química dos insetos.

Com base no que foi descrito acima, para melhor o entendimento e a visualização foi elaborado um “código de barras químico” embasado na composição química do tegumento de cada colônia, a fim de diferenciá-las.

Implementou-se o sistema de representação dos compostos por código de barras químico no presente estudo, com as seguintes regras básicas:

i) cada barra vertical preta indica a presença de um determinado composto, que são aqueles encontrados nas análises realizadas anteriormente (verificar Tabela 1);

ii) a ausência da barra vertical corresponde à ausência do composto que ela representa;

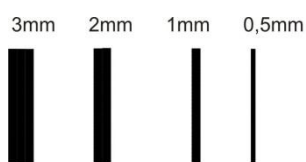
iii) o tamanho do código de barras é de 20 cm, respeitando a largura padrão de uma folha A4 (21cm) a fim de que a figura correspondente não ultrapassasse seus limites;

iv) cada composto (barra) ocupa o centro de um intervalo de 5mm, ou seja, ele está localizado no 3ºmm;

v) a espessura de cada barra vertical corresponde à concentração relativa do composto (esses valores são encontrados na Tabela 1), de forma que: as barras representando concentrações relativas entre 0 e 5% possuem 0,5mm de largura; barras representando compostos com concentrações relativa entre 5,1 e 10% possuem 1mm de largura; barras representando compostos com concentrações relativas entre 10,1 e 30% possuem 2mm de largura; compostos com concentrações relativas à partir de 30,1% são representados por barras com 3mm de largura (Figura 12);

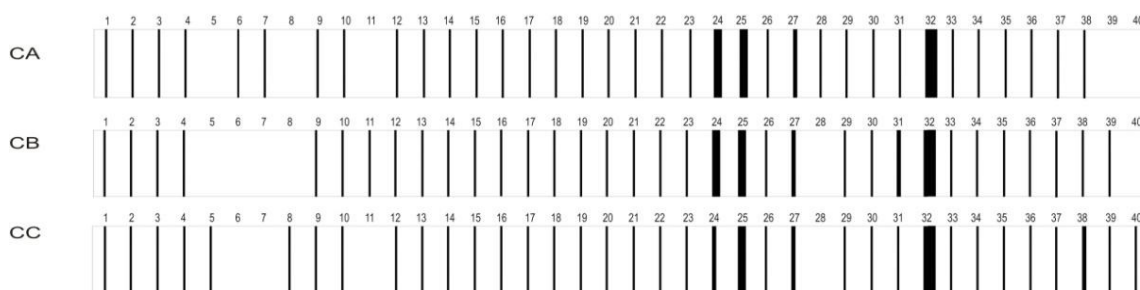
vi) o número acima (caractere) de cada barra vertical corresponde ao número do pico cromatográfico conforme sua sequência de eluição, em função do tempo de eluição, considerando-se as mesmas condições e parâmetros pré-estabelecidos na metodologia; portanto, os números são dispostos de forma crescente da esquerda para direita do diagrama do código de barras. Como foram encontrados 40 diferentes compostos, as barras apresentam números de 1 a 40 em sua parte superior.

Figura 12: Esquema ilustrativo das diferentes larguras das barras correspondentes a concentração relativa de cada composto: 0,5mm (0-5%); 1mm (5,1-10%); 2mm (10,1-30%); 3mm (maior que 30%).



Desta maneira, os resultados obtidos para as três colônias estão representados na Figura 13

Figura 13: Código de barras elaborado para diferenciar as três colônias. **CA:** código de barras da colônia A. **CB:** código de barras da colônia B. **CC:** código de barras da colônia C. **1:** decano, **2:** 2-metilnonan-5-ona, **3:** 3-metildecano, **4:** undecano, **5:** ácido (E)-7-oxooct-3-enóico, **6:** N-(5-metilhexil)acetamida, **7:** (E)-propil oct-5-enoato, **8:** ácido dodecanóico, **9:** ácido tetradecanóico, **10:** ácido 9-hexadecenóico, **11:** octil 2-(tiofenil-2-il)acetato, **12:** ácido hexadecanóico, **13:** 4-metilnonadecano, **14:** ácido 11-ocatecenóico, **15:** ácido octadecenóico, **16:** tricosano, **17:** tetracosano, **18:** pentacosano, **19:** 11-metiltetracosano, **20:** 2,19-dimetiltricosano, **21:** 3-metilpentacosano, **22:** hexacosano, **23:** 13-metilhexacosano, **24:** heptacosano, **25:** 2-metilheptacosano, **26:** 5,22-dimetilhexacosano, **27:** 3-metilheptacosano, **28:** octacosano, **29:** 10,11-dimetilheptacosano, **30:** 10,14-dimetilheptacosano, **31:** nonacosano, **32:** 13,14-dimetiloctacosano, **33:** 3,10-dimetiloctacosano, **34:** 4-metilnonacosano, **35:** 13-metilnonacosano, **36:** 14-metiltriacontano, **37:** hentriacontano, **38:** 15-metilhentriacontano, **39:** Dotriacontane, **40:** 15,16-dimetildotriacontano.



É notório que o composto **32**, identificado como hidrocarboneto (13,14-dimetiloctacosano) é predominante nas três colônias, com concentração relativa maior que 30%, seguido pelos compostos Heptacosane (**24**) e 2-metilheptacosano (**25**).

4.3 Bioensaios

Concluídas as análises químicas, iniciamos os ensaios biológicos do projeto, baseados inicialmente em observações do comportamento de reconhecimento de tipo parental. De acordo com os resultados observados nos vídeos dos bioensaios permitiram a construção das Tabelas 2 e 4. O Bioensaio de reconhecimento de tipos parentais da colônia revelou os seguintes comportamentos:

i) Experimento I: primeiramente ocorreu o comportamento de varredura da antena das vespas presentes na arena, sobre o tegumento da vespa “intrusa”, seguido da aceitação das vespas da colônia A em relação à introdução de uma vespa da mesma colônia;

ii) Experimento II: assim como no experimento I, houve a varredura da antena das presentes no tegumento da “intrusa”, porém esse comportamento foi seguido de 271 tentativas de ferroadas e 161 mordidas em média, provindas das vespas da colônia A em relação a “intrusa” (vespa da colônia B), ou seja, comportamento de rejeição;

iii) Experimento III: observou-se inicialmente o comportamento de varredura, sucedido de 250 ferroadas e 236 mordidas em média, oriundas das vespas da colônia A em relação à “intrusa” (vespa da colônia C), assim como observado no experimento II houve comportamento de rejeição. Observar tabela 2 e figura 14.

As comparações dos resultados obtidos na análise estatística foram:

i) Entre as colônias A e B houve diferença significativa com valores de $p < 0,01$ para mordidas e ferroadas, assim como na comparação entre as colônias A e C. Sendo assim, as análises estatísticas indicam significância das análises comportamentais realizadas (Tabela 3).

Figura 14: Número de ferroadas ou mordidas, referentes aos comportamentos de rejeição observados no Bioensaio de reconhecimento de tipos parentais da colônia, oriundas das vespas da colônia A após a introdução de vespas intrusas (vespas vivas) da colônia B e C. Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão.

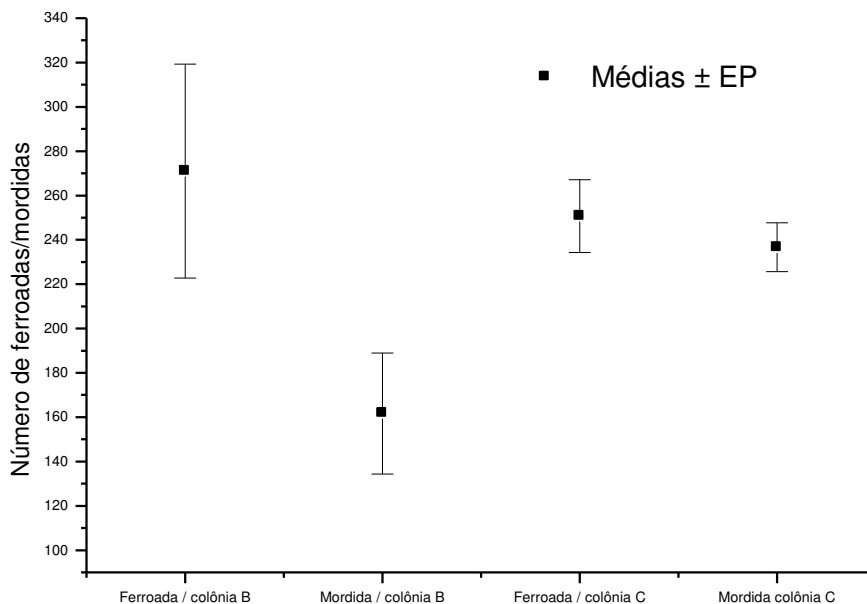


Tabela 2: Frequência de comportamentos de aceitação ou rejeição observados no Bioensaio de reconhecimento de tipos parentais da colônia oriundos das vespas da colônia A após a introdução de “intrusos” (vespas vivas) da colônia A, B e C, na arena. Os valores obtidos são referente á média \pm erro padrão.

Origem da vespa introduzida na arena	Colônia A		
	Varredura da antena no tegumento		
	ACEITAÇÃO (SIM/NÃO)	REJEIÇÃO	
		Ferroadas	Mordidas
Colônia A	SIM	0	0
Colônia B	NÃO	271 \pm 47	161 \pm 27
Colônia C	NÃO	250 \pm 16	236 \pm 10

Tabela 3: Análises estatísticas evidenciando as diferenças significativas na comparação entre os grupos CAxCB e CAxCC do Bioensaio de reconhecimento de tipos parentais da colônia. Todos com valores de $p \leq 0,001$

Comparação entre grupos	Valor de p	
	Ferroadas	Mordidas
CAxCB	≤ 0.001	≤ 0.001
CAxCC	≤ 0.001	≤ 0.001

O Bioensaio de reconhecimento de tipos parentais da colônia por intensificação do odor foi realizado aplicando-se na vespa "intrusa" (vespa viva) uma concentração cem vezes maior de extrato endógeno da própria colônia de onde a "intrusa" foi coletada; os resultados deste bioensaio estão mostrados na Tabela 4, que evidenciou os seguintes comportamentos:

i) Experimento IV: primeiramente ocorreu o comportamento de varredura da antena das vespas presentes na arena no tegumento da vespa "intrusa", após sua introdução (Figura 16), seguido da aceitação, ou seja, aprovação das vespas da colônia A em relação à "intrusa" (vespa da mesma colônia), uma vez que nenhum comportamento agressivo foi observado;

ii) Experimento V: observou-se a varredura da antena das operárias (oriundas da colônia A) presentes na arena, sobre o tegumento da "intrusa" (oriunda da colônia B), seguido de 470 tentativas de ferroadas e 326 mordidas em média providas das vespas da colônia A em relação a "intrusa" (vespa da colônia B), ou seja, comportamento de rejeição, como mostrado na Figura 17;

iii) Experimento VI: inicialmente registrou-se o comportamento de varredura, sucedido de 322 tentativas de ferroadas e 393 mordidas em média, oriundas das vespas da colônia A em relação a "intrusa" (vespa da colônia C), assim como observado no experimento V houve comportamento de rejeição. Observar tabela 4 e figura 15.

As comparações dos resultados obtidos da análise estatística foram:

i) Entre as colônias A e B houve diferença significativa com valores de $p < 0,01$ para mordidas e ferroadas, assim como na comparação entre as colônias A e C. Sendo assim, através das análises de estáticas realizadas pode-se verificar a significância estatística das análises comportamentais realizadas (Tabela 5).

Figura 15: Número de ferroadas ou mordidas, relativos aos comportamentos de rejeição observados no Bioensaio de reconhecimento de tipos parentais da colônia por intensificação do odor oriundos das vespas da colônia A após a introdução de vespas intrusas (vespas vivas) da colônia B e C. Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão.

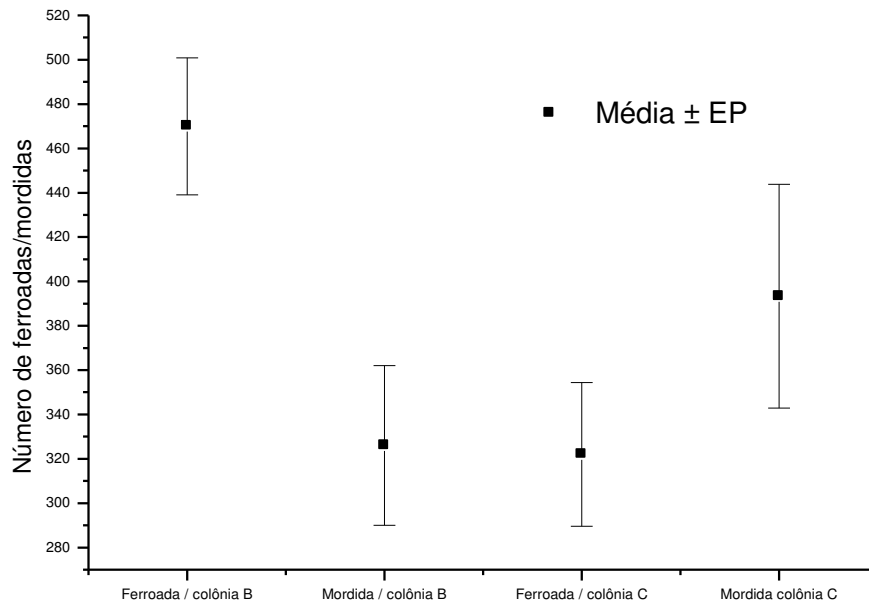


Tabela 4: Frequência de comportamentos de aceitação ou rejeição observados no Bioensaio de reconhecimento de tipos parentais da colônia por intensificação do odor, oriundos das vespas da colônia A após a introdução de “intrusos” (vespas vivas) da colônia A, B e C, na arena. Os valores obtidos são referente á média \pm erro padrão.

Origem da vespa introduzida na arena	Colônia A		
	Varredura da antena no tegumento		
	ACEITAÇÃO (SIM/NÃO)	REJEIÇÃO	
		Ferroada	Mordida
Colônia A	SIM	0	0
Colônia B	NÃO	470 \pm 30	326 \pm 35
Colônia C	NÃO	322 \pm 32	393 \pm 50

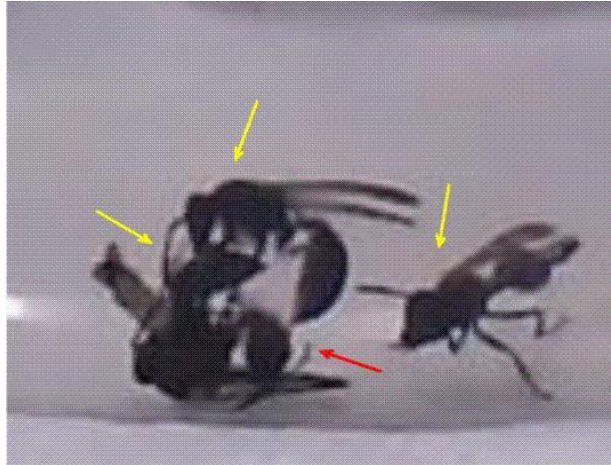
Tabela 5: Análises estatísticas evidenciando diferenças significativas na comparação entre os grupos **CAxCB** e **CAxCC** ($p \leq 0,01$) do Bioensaio de reconhecimento de tipos parentais da colônia por intensificação do odor. Todos com valores de $p \leq 0,001$.

Comparação entre grupos	Valor de p	
	Ferroada	Mordida
CAxCB	≤ 0.001	≤ 0.001
CAxCC	≤ 0.001	≤ 0.001

Figura 16: Comportamento de varredura da antena das vespas presentes na arena no tegumento da vespa “intrusa” (indicada pela seta vermelha), após sua introdução. Imagem retirada a partir da filmagem dos experimentos de bioensaios.



Figura 17: Comportamento de rejeição. Vespa “intrusa” (indicada pela seta vermelha), sendo ferroadada e mordida por vespas presentes na arena (indicadas por seta amarela). Imagem retirada a partir da filmagem dos experimentos de bioensaios.



5. DISCUSSÃO

Para análise em GC-MS, através da comparação entre as três colônias pode-se observar que existe um conjunto de 32 compostos comuns às três colônias, que de fato constituem uma parte do coquetel químico, responsável pelo reconhecimento de tipo parental da espécie *Polybia paulista*; este coquetel pode ser comparado entre as diferentes colônias, permitindo identificar cada componente químico, bem como sua concentração relativa no coquetel, os mesmo estão descritos abaixo:

Alcanos saturados ramificados: 3-metildecano; 4-metilnonadecano; 11-metiltetracosano; 2,19-dimetiltricosano; 3-metilpentacosano; 13-metilhexacosano; 2-metilheptacosano; 5,22-dimetilhexacosano; 3-metilheptacosano; 10,11-dimetilheptacosano; 10,14-dimetilheptacosano; 13,14-dimetiloctacosano; 3,10-dimetiloctacosano; 4-metilnonacosano; 13-metilnonacosano; 14-metiltriacontano; 15-metilhentriacontano.

Alcanos saturados não ramificados: decano ; undecano; tricosano; tetracosano; pentacosano; hexacosano; heptacosano; nonacosano; hentriacontano; dotriacontano.

Ácidos: ácido tetradecanóico; ácido 9-hexadecenóico; ácido hexadecanóico; ácido 11-ocatecenóico; ácido octadecenóico.

Cetonas: 2-metilnonan-5-ona.

Foram identificados compostos, que aparentemente são responsáveis pelo reconhecimento de tipo parental de cada colônia, neste sentido para a colônia A (CA) os compostos específicos desse ninho são três. São eles:

Alcanos saturados não ramificados: octacosano.

Ésteres metílicos: (E)-propil oct-5-enoato.

Amidas: N-(5-metilhexil)acetamida.

Assim como também para a colônia B (CB) possui apenas um composto, correspondente ao pico 11 (octil 2-(tiofenil-2-il)acetato).

E por fim a colônia C (CC) possui três compostos específicos desse ninho. São eles:

Alcanos saturados ramificados: 15,16-dimetildotriacontano

Ácidos: ácido (E)-7-oxooct-3-enóico; ácido dodecanóico.

Assim como foram encontrados em nossas análises alguns compostos quimicamente mais voláteis, específicos de cada colônia, que aparentemente são responsáveis pelo reconhecimento de tipo parental, existem dados na literatura sobre formigas, no qual operárias reconhecem suas companheiras de colônia por meio de sinais químicos distribuídos sobre o

tegumento, as quais provavelmente são originários da cabeça do inseto, e mais particularmente do feromônio de alarme da espécie (BLUM, 1968).

Esses feromônios de alarme são empregados, principalmente, na atração e alerta dos companheiros e na orientação de ataque do inimigo. Blum (1968) encontrou o composto 4-metil-3-heptnona que foi identificado como feromônio de alarme, produzido pela glândula mandibular da formiga *Atta texana*, encontrou ainda 2-heptanona, porém se mostrou menos ativo como feromônio de alarme. Riley et al, (1974) identificaram outros feromônios de alarme, como componentes principais, o 3-octanol, e o 3-octanona.

Pode se observar também que além dos compostos mais voláteis que se encontram na região inicial dos cromatogramas existem alguns hidrocarbonetos específicos para cada colônia que são possíveis responsáveis pelo reconhecimento de tipo parental da colônia. Na literatura também encontramos alguns exemplos de que o perfil de hidrocarbonetos (CHs) encontrados na cutícula de alguns insetos sociais é responsável pelo reconhecimento de tipo parental.

Akino e colaboradores (2004) demonstraram que CHs da cutícula na formiga *Formica japonica* servem como discriminador para as operários e ambos n-alcenos e (Z)-9-alcenos com número ímpar de átomos de carbono no intervalo de 25 a 33, são necessárias para discriminar companheiras de intrusos.

Os hidrocarbonetos identificados no tegumento da *Polybia paulista*, principalmente n-alcenos e alcenos ramificados são predominantes nas três colônias, tanto qualitativamente como quantitativamente. Além disso, os hidrocarbonetos se apresentaram com concentração maior se comparado a qualquer outro composto de função orgânica diferente.

Uma análise da tabela 1, revela que existe uma grande quantidade de compostos do tipo alcenos com ramificação metil, que corroboram com dados encontrados na literatura, os quais descrevem que este é o perfil característico geral de hidrocarbonetos encontrado no tegumento de vespas do gênero *Polistes*, e também de outras espécies de insetos (DANI, 2009).

Lockey (2008) encontrou no tegumento de vespas *Polistes* alcenos com ramificação metil na porção terminal em posição 2 ou 3, e metilalcenos com ramificações na porção central do esqueleto alfa-carbônico. Assim como descrito encontrou-se no tegumento de *Polybia paulista* alcenos com ramificação metil tanto terminal quanto central, alguns exemplos são: 2-metilheptacosano, 3-metildecano, 4-metilnonadecano, 11-metiltetracosano, 13-metilhexacosano (picos cromatográficos 25, 3, 13, 19 e 23 respectivamente, disponíveis em tabela1).

Para alguns alcanos com número ímpar de carbonos em sua cadeia principal, o conjunto de séries de isômeros posicionais carregam o grupo metil em posições ímpares. Alcanos com número par de carbonos em sua cadeia principal podem carregar o grupo metil em ambas posições ímpar e par (DANI, 2009). Pode-se citar alguns exemplos encontrados em *Polybia paulista*, 3-metildecano, 11-metiltetracosano, 3-metilpentacosano (picos cromatográficos 3, 19 e 21 respectivamente, disponíveis em tabela 1).

No trabalho realizado por Oystayen et al. (2014) foram relatados e comparados “feromônios de rainha” de diferentes linhagens de abelhas, vespas e formigas que desempenham um importante papel na inibição reprodutiva de suas respectivas operárias. Os resultados demonstram que os feromônios responsáveis por esta inibição são hidrocarbonetos saturados de cadeia longa, como por exemplo, nC25, nC-27, nC28, nC-29, e um deles metil-ramificado, o 3-MeC29; todos estes compostos também foram encontrados no tegumento das vespas deste trabalho, exceto o 3-MeC29, sugerindo que as rainhas das colônias de *P. paulista* investigadas estavam ativamente produzindo e secretando tais componentes, que aparentemente permanecem no tegumento das operárias, e de alguma maneira ainda não bem conhecida exercem seus efeitos de inibição do desenvolvimento ovarianos destas operárias.

Além dos hidrocarbonetos foram encontrados também no tegumento das vespas alguns ésteres metílicos, que na literatura estão relacionados á feromônios de alarme, ou ainda segundo Dor et al.(2005) esses feromônios também podem ser produzidos pela glândula de Dufour, operando aparentemente como um sinal de fertilidade. O desenvolvimento do ovário está fortemente ligado à secreção da glândula de Dufour da rainha, e o aumento da produção de ésteres por esta glândula pode servir como um sinal confiável de fertilidade.

Em *Polistes* tem sido demonstrado que glândula de Dufour contém os mesmo hidrocarbonetos como aqueles encontrados no tegumento, embora em porcentagens diferentes (DANI, 2009).

Segundos estudos de Abdalla et al., (2003) o processo de reconhecimento de tipos parentais, sugere que os fatores genéticos e ambientais contribuem para formação dos odores específicos de reconhecimento da colônia. Disponibilidade e o tipo de alimentos encontrados na natureza e armazenados na colônia, e a dieta individual também podem afetar a composição de hidrocarbonetos produzidos pela glândula de Dufour, como observado em um estudo com mamangava *Bombus*, realizado por Hefetz et al., (1993).

Alguns autores sugerem que a abundância de alcanos com ramificação metil é uma característica hereditária e, portanto são candidatos adequados como feromônios de reconhecimento de tipo parental. Esses autores também sugerem que por causa de suas

estruturas os alcanos com ramificação metil podem ser mais adequados como feromônios de reconhecimento de tipo que n-alcanos. (DANI, 2009).

Ésteres com número de carbono maior que 28 não foram encontrados em nossas análises, porém segundo Martin e Jones (2004) a presença de ésteres entre C28-C38 como produtos da biossíntese de ácidos graxos pela glândula de Dufour, estão associados á rainha e relacionados com sua postura de ovos.

Os compostos oxigenados aparentam ser mais importantes que os hidrocarbonetos para o reconhecimento de tipo em *Apis mellifera* (LANDOT, 1998). Alguns ácidos graxos das glândulas de Van der Vecht (glândula no sexto esternito do metassoma), principalmente palmítico, linoleico e oleico foram reportados na vespa *P. anullaris*, sendo assim o primeiro pôde também ser encontrado no tegumento de *P. paulista*.

Além das diferenças qualitativas observou-se também diferenças nas concentrações relativas de cada composto encontrado no tegumento da vespa, entre as três diferentes colônias. A concentração relativa de um determinado composto varia de uma colônia para a outra (valores disponíveis tabela 1).

Como por exemplo, para colônia A, B e C o composto 13,14-dimetil octacosano (pico cromatográfico 32) é o mais abundante para estas colônias, sendo sua área relativa em cada amostra de 35,31, 30,51, e 34,4 respectivamente).

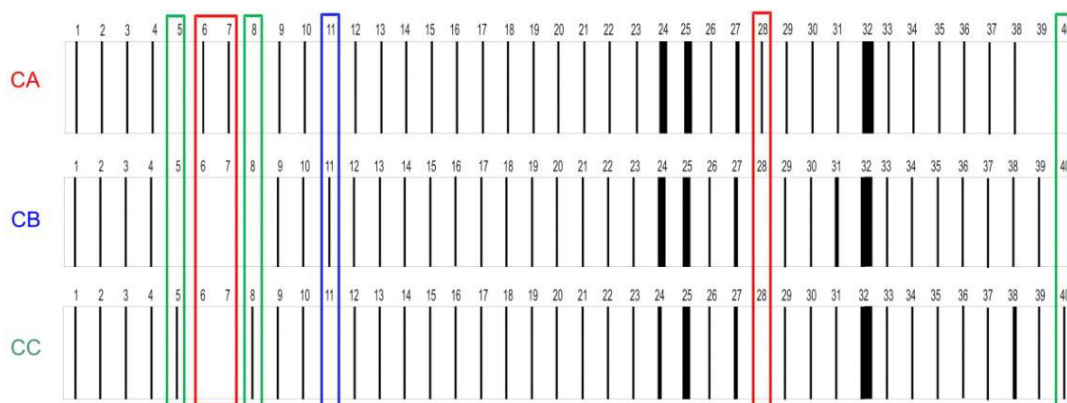
Esta variação na concentração dos compostos intercolônias também pode contribuir no processo de reconhecimento de tipo parental, assim como descrito por Espelie (1994); a abundancia relativa de alcanos com ramificação metil encontrados no tegumento de vespas *P. fucattus* é importante para classificação de indivíduos da própria colônia em relação á colônias irmãs. Diferenças quantitativas também podem influenciar no reconhecimento de castas, fertilidade ou infertilidade.

Através da comparação entre os “códigos de barras químicos” observado na Figura 13, pode-se observar que existe conjunto de 32 compostos comuns às três colônias, que de fato constituem o coquetel químico, responsável pelo reconhecimento da espécie *P. paulista*; este coquetel pode ser comparado entre as diferentes colônias, permitindo identificar cada componente químico, bem como sua concentração relativa no coquetel.

Foi possível observar também os compostos que são específicos para cada colônia, ou seja, os compostos que possivelmente são responsáveis pelo reconhecimento de tipo parental entre indivíduos da mesma colônia. Para a colônia A (CA) os compostos 6, 7 e 28 (N-(5-metilhexil) acetamida, (E)-propil octa-5-oato e octacosano) são específicos desse ninho. Para a colônia B (CB) o composto 11(octil 2-(thiofen-2-il)acetato) é específico dessa colônia; e por

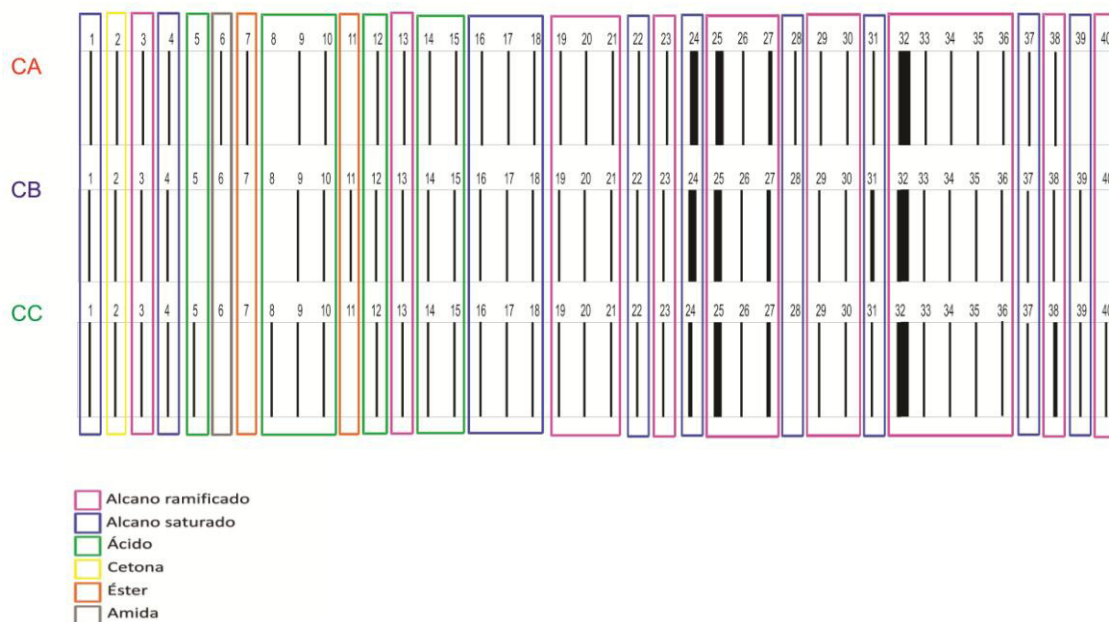
fim a colônia C (CC) possui os compostos 5, 8 e 40 (Ácido (E)-7-oxooct-3-enóico, Ácido Dodecanóico (Ácido Láurico), 15,16-dimetildotriacontano específicos (Figura 18).

Figura 18: Código de barras elaborado para diferenciar as três colônias destacando em cores diferentes os compostos diferenciados em cada uma delas. CA: código de barras da colônia A; 6, 7 e 28 contornado em vermelho. CB: código de barras da colônia B; 11 contornado em azul. CC: código de barras da colônia C; 5, 8 e 40 contornado em verde. Os números acima do código de barras são correspondentes aos números dos picos encontrados na Tabela 1.



Já através da figura 19 foi possível evidenciar compostos segundo suas funções orgânicas, em que cada cor corresponde a uma função orgânica. É possível observar a prevalência tanto qualitativa, quanto quantitativa de n-alcanos saturados e ramificados em ambas as três colônias.

Figura 19: Código de barras elaborado destacando em cores diferentes o agrupamento de compostos que possuem a mesma função orgânica. Em cor-de-rosa estão destacados os compostos pertencentes aos alcanos ramificados, em azul estão os n-alcanos saturados, em verde estão os ácidos, em amarelo estão as cetonas, em laranja estão os ésteres e finalmente em cinza estão as amidas. Os números acima do código de barras são correspondentes aos números dos picos encontrados na Tabela 1.



O “código de barras químico” permitiu a transformação de extensos cromatogramas e espectros de massas dos compostos identificados, em uma ferramenta simples, facilitando a visualização, compreensão e comparação das composições químicas dos feromônios de reconhecimento de tipos parentais de diferentes colônias.

Segundo Hölldobler e Michener, (1980) a capacidade em reconhecer companheiras de ninho e distingui-las de intrusos fundamenta-se no fato de que cada colônia tem sua própria “assinatura química”, ou seja, um odor característico, uma mistura de substâncias químicas específicas e características de cada colônia (assim como foi demonstrado a partir das análises GC-MS das três colônias distintas).

A partir dos resultados do Bioensaio de reconhecimento de tipos parentais da colônia descritos anteriormente, o experimento I evidenciou aceitação, portanto o reconhecimento do odor da vespa “intrusa” como sendo de indivíduo da mesma colônia. Porém, nos experimentos II e III ocorreu o contrário, pois apresentaram características comportamentais de não reconhecimento do odor da vespa “intrusa” como sendo de indivíduo da mesa colônia.

Observamos também que no do Bioensaio de reconhecimento de tipos parentais da colônia por intensificação do odor, a intensificação do odor característico da vespa intrusa

(pela aplicação de extrato endógeno da própria colônia da "intrusa"), nos experimentos V e VI houve um aumento expressivo e no número de comportamentos agressivos (mordidas e ferroadas), que caracterizam a não aceitação da operária "intrusa".

Informações adicionais observadas nos bioensaios

Para maioria dos experimentos de bioensaio realizados a vespa introduzida na arena é distinguida pelas vespas presentes na arena, geralmente dois minutos e meio após sua introdução. Para o Experimento II, III, V e VI foi observado que as vespas "intrusas" são agredidas (mordidas e/ou ferroadas) até sua morte. Além disso, foi também notado comportamento de *allogrooming* (limpeza e lambeduras entre diferentes indivíduos na colônia).

6. CONCLUSÃO

A utilização do sistema analítico de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi eficiente para analisar, caracterizar, identificar, além de diferenciar colônias de uma mesma espécie através da composição química dos compostos de baixa massas moleculares encontrados no tegumento. E ainda, auxiliando na determinação de possíveis marcadores moleculares tanto para o reconhecimento de tipos parentais da espécie, ou seja, responsável pelo reconhecimento da espécie *P. paulista*, quanto para o reconhecimento de tipos parentais específicos de cada colônia, ou seja, responsável pelo reconhecimento entre indivíduos da mesma colônia.

Assim como, a realização dos bioensaios foi um ponto importante na caracterização da funcionalidade dos compostos voláteis presentes no tegumento de operárias de *P. paulista*, em relação ao papel destes compostos como feromônios de reconhecimento de tipos parentais.

Portanto, a partir da análise GC-MS e dos bioensaios realizados, pode-se concluir, que existe diferença no perfil de composição química tanto qualitativo, quanto quantitativo, entre colônias diferentes de uma mesma espécie. E como essas diferenças de perfis encontrados no tegumento desses insetos estão intimamente relacionadas à comunicação química, ou seja, no reconhecimento de tipos parentais entre diferentes colônias, pelo menos no caso desta espécie (*P. paulista*). Desta maneira, no tegumento das vespas foram identificados 32 compostos comuns (principalmente hidrocarbonetos) a diferentes colônias de *P. paulista*, que aparentemente constituem a base química de reconhecimento da espécie, os quais são: decano; 2-metilnonan-5-ona; 3-metildecano; undecano; ácido tetradecanóico (ácido mirístico); ácido 9-hexadecenóico; ácido hexadecanóico (ácido palmítico); 4-metilnonadecano; ácido 11-ocatecenóico; ácido octadecenóico (ácido esteárico); tricosano; tetracosano; pentacosano; 11-metiltetracosano; 2,19-dimetiltricosano; 3-metilpentacosano; hexacosano; 13-metilhexacosano; heptacosano; 2-metilheptacosano; 5,22-dimetilhexacosano; 3-metilheptacosano; 10,11-dimetilheptacosano; 10,14-dimetilheptacosano; nonacosano; 13,14-dimetiloctacosano; 3,10-dimetiloctacosano; 4-metilnonacosano; 13-metilnonacosano; 14-metiltriacontano; hentriacontano; 15-metilhentriacontano e dotriacontano.

Enquanto que foram identificados alguns compostos, que aparentemente são responsáveis pelo reconhecimento de tipo de cada colônia. Neste sentido, na colônia A os compostos N-(5-metilhexil) acetamida, (E)-propilocta-5-oato e octacosano são específicos desse ninho; enquanto que para colônia B o composto octil 2-(tiofen-2-il) acetato é específico dessa colônia, e por fim a colônia C possui os compostos ácido(E)-7-oxooct-3-

enólico, ácido Dodecanóico (Ácido Láurico), e 15,16-dimetildotriacontano como específicos da mesma.

PERSPECTIVA FUTURA

O Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica do CEIS/IBRC-UNESP adquiriu um novo sistema analítico da empresa Shimadzu, que permitirá a realização de cromatografias gasosas bidimensionais, por se tratar de um sistema GC x GC-MS (GCMS-QP2010 Ultra/SE). Esse investimento na infra-estrutura do grupo possibilitará a reanálise dos extratos do tegumento das vespas com um instrumento de muito maior poder de separação e identificação dos componentes minoritários destas amostras. Os avanços tecnológicos incorporados nesse instrumento resultam em cromatogramas que apresentam uma relação sinal/ruído dez vezes maiores que o sistema anterior. Permitindo assim o aprofundamento no conhecimento sobre a composição e a funcionalidade dos compostos voláteis presentes no tegumento de operárias de *P. paulista*, em relação ao papel destes compostos como feromônios de reconhecimento de tipos parentais, através da otimização e realização de bioensaios.

7 REFERÊNCIAS

- ABDALLA, F. C.; CRUZ-LANDIM, C. Dufour glands in the hymenopterans (Apidae, Formicidae, Vespidae): a review. **Rev Brasil Biol**, v. 61, p. 96-100, 2001.
- ABDALLA, F. C.; GRAEME, J. R.; MORGAN, E. D.; CRUZ-LANDIM, C. Estudo comparativo da composição de hidrocarbonetos cuticulares de *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) operárias e rainhas. **Genet. Mol.**, p. 191-199, 2003.
- ADAMS, P. R **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. v. 4, 2007.
- AKRE R.D. Social wasps. In: HERMAN, H. R. (Ed.). **Social Insects**, v. 4, p. 1–105, 1982.
- ALI, M. F.; MORGAN, E. D. Chemical communication in insect communities: A guide to insect pheromones with special emphasis to social insects. **Biol Ver**, v. 65, p. 227–247, 1990.
- AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. BioEstat 5.0. **Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas**. Sociedade Civil Mamirauá: Belém, Pará, Brasil. p. 324, 2007. Disponível em <<http://bioestat.software.informer.com>> Acesso em : 13 de jun. 2012.
- BILLEN, J.; MORGAN, E. D. **Pheromone communication in social insects: Sources and secretions**. In: VANDER MEER R.K.; BREED M.D.; ESPELIE K.E.; WINSTON M.L. (Eds.). **Pheromone Communication in Social Insects**, 1998. p. 3–33.
- BLUM. M. S.; PADOVANI, F. Ailkanones and terpenes in the mandibular glands of *Atta* species. **Comp. bioch. physiol.**, v.26, p. 291-299, 1968.
- BLUM, M. S. Alarm pheromones. In: G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, (Eds.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. v. 9, 1985. p. 193–224.
- BRUSCHINI, C.; CERVO, R.; TURILLAZZI, S. Pheromones in Social Wasps. **Vitamins and Hormones**, v. 83, p. 446-452, 2010.
- BRUSCHINI, C.; CERVO, R.; CINI, A.; PIERACCINI, G.; PONTIERI, L.; SIGNOROTTI, L.; TURILLAZZI, S. Cuticular Hydrocarbons Rather Than Peptides Are Responsible for Nestmate Recognition in *Polistes dominulus*. **Chemical Senses**, v. 36, p. 715-723, 2011.
- BUSSAB, W.O. & MORETTIN, P. A. **Estatística básica**, v. 5, 2002.
- CHAUD-NETTO, J.; GOBBI, N.; MALASPINA, O. **Biologia e técnicas de manejo de abelhas e vespas**. In Venenos animais: Uma visão integrada. Editora de Publicações Científicas Ltda, Rio de Janeiro, 1994. p.173-193.
- DANI, R. F. Cuticular Lipids as Semiochemicals in Paper Wasps and Other Social Insects. **Ann. Zool. Fennici.**, v. 43, p. 500-514, 2009.

DOR, R.; KATZAV-GONSKY, T.; HEFETZ, A. Dufour's gland pheromone as a reliable fertility signal among honeybee (*Apis mellifera*) workers. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. v. 58, p. 270-276, 2005.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends Anal. Chem.*, v. 24, n. 4, 2005.

EBERHARD, W. J. M. The Social Biology of Polistine Wasps. **Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan**. n. 140, p. 8-15, 1969.

FARB, P. Os Insetos. Biblioteca da Natureza Life. Editora livraria José Olympio. p. 9-15, 1973.

FIEHN, O.; KOPKA, J.; DÖRMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHERWAY, R. N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.*, v. 18, p. 1157-1161, 2000.

FIEHN, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.*, v. 48, 2002. p. 155-171.

GLASSBROOK, N.; BEECHER, C.; RYALS, J. Metabolic profiling on the right path. *Nat. Biotechnol.*, v. 18, p. 1142-1143, 2000.

GREENE, M. J.; GORDON, D. M. Social insects: Cuticular hydrocarbons inform task decisions. *Nature*, v. 32, p. 423, 2003.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA A.; BALL S. L.; DEWAARD J. R. **Biological identifications through DNA barcodes**. Proceeding of the Royal Society of London, 2003. p.313-321.

HEFETZ, A.; TENGO, J.; LÜBKE, G.; FRANCKE, W. **Varição inter-colonial e intracolonial na secreção da glândula de Dufour nas espécies de abelha *Bombus hypnorum* (Hymenoptera: Apidae)**. In: *sistemas sensoriais de artrópodes* (Weise, K., Gribakin, FG e Renninger, G., eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, Suíça, 1993. p. 469-480.

HÖLLDOBLER, B.; MICHENER, C. D. **Mechanisms of identification and discrimination in social hymenoptera**. In: MARKL, H. Evolution of social behavior: hypotheses and empirical tests. Weinheim : Chemie Gmbh, 1980. p.35-38.

HOLLYWOOD, K.; BRISON, D.; GOODACRE, R. Metabolomic: current technologies and future trends. *Proteomics*, v. 6, p. 4716-4723, 2006.

KLACZKO, L. B.; VIEIRA, R. D. **Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica no Brasil-Genética**. Ministério do Meio Ambiente, 2003. p. 68.

LANDOLT, P. J.; JEANNE, R. L.; REED, H. C. **Chemical communication in social wasps**. In: VANDER MEER, R. K.; BREED, M. D.; WINSTON, M. L.; ESPELIE, K. E. (Eds.). **Pheromone Communication in Social Insects. Ants, Wasps, Bees and Termites**. 1998. p. 216-235.

MARTIN, S. J.; JONES, G.R. *Conservation of Bio synthetic pheromone pathways in honey bees Apis*. **Natur-wissenschaften**, v. 91, p. 232-236, 2004.

MASCHWITZ, U. Gefahrenalarmstoffe and Gefahrenalarmierung bei sozialen Hymenopteren. **Z. Vergl. Physiol.**, v. 47, p. 596–655, 1964.

MORITZ, T.; LUNDGREN, K.; ROESSNER-TUNALI, U.; FORBES, M. G.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R.; KOPKA, J. GC–MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS Letters**, v. 579, p. 1332–1337, 2005.

POWERS, T. Nematode Molecular Diagnostic: From Bands to Barcodes. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 42, p. 367-383, 2004.

RICHARDS, O. W.; RICHARDS, M. J. Observations on the social wasps of South America (Hym., Vespidae). **Transactions Royal Entomological Society**, 102 (1), 1951. p. 1-170.

ROSS, K. G.; MATTHEWS, R. W. **The Social Biology of Wasp**. Department of Entomology, University of Georgia, 1991. p. 77-79.

RUPPERT, E. E.; FOX, S. R.; BARNES, D. R. **Zoologia dos Invertebrados Uma Abordagem Funcional-Evolutova**. Editora Roca Ltda. v. 7, 2005. p. 843-870.

SCHAUER, N.; STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S.; SCHOMBURG, D.; ALLISON, G.; VAIDYANATHAN, S.; ROWLAND, J. J.; KELL, D. B.; GOODACRE, R. Discrimination of aerobic endospore-forming bacteria via electrospray ionization mass spectrometry of whole cell suspensions. **Anal. Chem.**, v. 73, p. 4134–4144, 2001.

SCHAUER, N.; STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S.; SCHOMBURG, D.; ALLISON, G.; MORITZ, T.; LUNDGREN, K.; ROESSNER-TUNALI, U.; FORBES, M. G.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R.; KOPKA, J. GC–MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS Letters**, v. 579, p. 1332–1337, 2005.

SCHMIDT, J. O. **Hymenopteran venoms: Striving toward the ultimate defense against vertebrates**. In: EVANS L.D.; SCHMIDT J.O. (Eds.). *Insect Defenses*. 1990. p. 387–419.

SILVA, D. D.; INNOCENTINI, P. A.; CHIERICE, O. G.; GALHIANE, S. M.; SANTOS, S. L. Avaliação da seletividade de uma nova coluna capilar em cromatografia gasosa –teste de GORB e índice de retenção. **Revista Analytica**, v. 17, p. 40-47 2005.

STARR, C. K. **Holding the fort: Colony defence in some primitively social wasps**. In: (EVANS D.L.; SCHMIDT J.O. (Eds.) *Insect Defense, Adaptive Mechanisms and Strategies of Prey and Predators*, 1990. p. 421–463.

STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R.; QUELLER, D. C. Colony defense in the social Wasp, *Parachartergus colobopterus*. **Biotropica**, v. 22, p. 324–327, 1990.

TRHLIN, M; RAJCHARD, J. Chemical Communication in the Honeybee (*Apis mellifera* L.): a review. **Veterinarni Medicina**, v.56, p.265-273, 2011.

VAN ZWEDEN, S. J.; D'ETTORRE, P. Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. *Insect Hydrocarbons: **Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology***. Cap. 11, 2010. p. 222-232.

VAN WILGERBURG, E.; SULC, R.; SHEA, J. K.; TSUTSUI, N. D. Deciphering the Chemical Basis of Nestmate Recognition. ***Journal of Chemical Ecology***, v. 36, p. 751-758, 2010.

VEERESH, L. S.; ANNE-GENEVIEVE, B. E.; MARILYN, K.; GARY J. B.; COBY, S. Cuticular Hydrocarbons of the dampwood termite, *Zootermopsis evadensis*: caste differences and role of lipophorin in transport of hydrocarbons and hydrocarbon metabolites. ***Journal of Chemical Ecology***, v. 26, n. 3, 2000.

VILHELMSSEN, L.; ISTVAN MIKÓ; KROGMAN. L. Beyond the wasp-waist: structural diversity and phylogenetic significance of the mesosoma in apocritan wasps (Insecta: Hymenoptera). ***Zoological Journal of the Linnean Society***, v. 159, p. 22–194, 2010.

WANT, E. J.; O'MAILLE, G.; SMITH, C. A.; BRANDON, T. R.; URITBOONTHAI, W.; QIN, C.; TRAUGER, S. A.; SIUZDAK, G. Solvent-Dependent Metabolite Distribution, Clustering, and Protein Extraction for Serum Profiling with Mass Spectrometry. ***Anal. Chem.*** v. 78, p. 743-752, 2006.

ANEXO I

**Tabela do Cálculo do Índice de Retenção dos Compostos Encontrados no Tegumento da
*Vespa Polybia paulista***

Tabela do Cálculo de Índice de Retenção. I: Índice de retenção do composto; I(NIST): Índice de retenção e nome do composto encontrado na biblioteca NIST; I(ADAMS): Índice de retenção e nome do composto encontrado no Identificaçã of essencial oil components by gas chromatography/massspectrometry; I(Pherobase): Índice de retenção e nome do composto encontrado no banco de dados on-line Pherobase (feromônios de insetos e semioquímicos -[<http://www.pherobase.com/>]; NT: Não Têm, índice de retenção não encontrado; Nome: nome final do composto encontrado na amostra do extrato do tegumento da vespa *Polybia paulista*.

Pico	Tempo de	m/t	I	I (NIST)	I (Adams)	I (Pherobase)/coluna	Nome
Pico1	3.745	142	-	1015(Decane)	1000(Decane)	1000(Decane)/HP-101	Decane/Decanoic acid
Pico2	4.853	156	1059	1051(Decane, 2-methyl)	NT	1053(Hexan-3-one)/HP-Wax	2-methylnonan-5-one
Pico3	4.984	156	1064	1086(2,3-Dimethyldecane)	NT	1063(2-Methyldecane)/DB-5	3-methyldecane
Pico4	5.507	156	1095	1115(Undecane)	1100(Undecane)	1099(Undecano)/DB-5	Undecane
Pico5	5.610	156	1101	NT	1101(2Z-Heptenyl acetate)	(1-Heen-3-one)/FFAP	(E)-7-ooct-3-enoic acid
Pico6	6.123	157	1130	NT	1130(Cyclohexyl propanoate)	1130(N-(2-Methylbutylidene)-2-methylbutylamine)/DB-Wax	N-(5-methylhexyl)acetamide
Pico7	6.311	184	1141	NT	1147(Butanoate)	1142(2-Methylbutyl pentanoate)/DB-1	(E)-propyl oct-5-enoate
Pico8	13.969	200	1529	NT	1529(Methyl dodecanoate)	1527(Methyl dodecanoate)/HP-5	Dodecanoic acid(Lauric acid)
Pico9	17.3	228	1731	1680(Methyl tetradecanoate)	1722(Methyl tetradecanoate)	1727(Methyl tetradecanoate)/HP-5	Tetradecanoic acid(Myristic acid)
Pico10	19.834	254	1895	1886(7-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z))	NT	1894((Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid methyl ester)	9-Hexadecenoic acid
Pico11	19.965	254	1903	1922(Benzene, (1-methylidodecyl))	NT	1914(2-Acetyl-5-methylthiophene)/HP-Innowax	Palmitic acid
Pico12	20.189	256	1921	1878(Palmitic acid, methyl ester)	NT	2091(2-Methyl-1, eicoseno)/DB-5	4-methylnonadecane
Pico13	23.745	296	2090	2109(Heneicosane)	NT	1926(Methyl hexadecanoate)/HP-5	11-octadecenoic acid
Pico14	23.836	282	2094	2085(9-Octadecenoic acid (Z), methyl ester)	NT	2092(2-Methyl-1, eicoseno)/DB-5	Stearic acid
Pico15	24.55	284	2120	2077(Methyl octadecanoate)	2126(Methyl octadecanoate)	2128(Methyl octadecanoate)/DB-5	Tricosano
Pico16	29.497	324	2322	NT	2300(Tricosane)	2300(Tricosane)/DB-5	Tetracosano
Pico17	31.202	338	2400	2407(Tetracosane)	2400(Tetracosane)	2400(Tetracosane)/DB-5	Pentacosano
Pico18	32.518	352	2509	2566(pentacosane)	2500(Pentacosane)	2500(Pentacosane)/DB-5	11-methyltetracosano
Pico19	32.918	366	2543	2542 (Eicosane, 7-hexyl)	NT	2537(11-Methylpentacosane)/OV-101	2,19-dimethyltricosano
Pico20	33.099	352	2557	NT	2557(Hinokienone)	2558 (11,20-Dimethyltricosano)/DB-1	3-Methylpentacosano
Pico21	33.336	366	2576	NT	NT	2574(3-Methylpentacosano)/DB-5MS	Hexacosano
Pico22	33.625	366	2632	NT	NT	2633(13-Methylhexacosano)/DB-5MS	Heptacosano
Pico23	33.964	380	2632	NT	NT	2633(13-Methylhexacosano)/DB-5MS	2-methylheptacosano
Pico24	34.625	380	2696	2705(Heptacosane)	2700(Heptacosane)	2700(Heptacosane)/DB-1	5,22-dimethylhexacosano
Pico25	34.979	394	2729	NT	NT	2730(5-Methylheptacosano)/SE-30	3-methylheptacosano
Pico26	35.173	394	2747	2740(7-Hexyldocosane)	NT	2730(5-Methylheptacosano)/OV-101	octacosano
Pico27	35.438	394	2771	NT	NT	2758 (11,15-Dimethylheptacosano)/OV-101	10,11-dimethylheptacosano
Pico28	35.717	394	2800	2804(Octacosane)	2800(Octacosane)	2773(3-methylheptacosano)/DB-5MS	10,14-dimethylheptacosano
Pico29	35.810	408	2803	NT	NT	2806(3,15-Dimethylheptacosano)/DB-5MS	Nonacosano
Pico30	36.145	408	2828	2904(Nonacosane)	2900(Nonacosane)	2809(11,15-Diethylhexacosano)/SE-30	13,14-dimethyloctacosano
Pico31	37.069	408	2893	NT	NT	2900(Nonacosane)/DB-1	3,10-dimethyloctacosano
Pico32	37.528	422	2925	NT	NT	2900(Nonacosane)/DB-1	4-methylnonacosano
Pico33	38.210	422	2971	NT	NT	2972(7,15-Dimethylnonacosano)/DB-5MS	13-methylnonacosano
Pico34	38.300	422	2978	NT	NT	2975(3-methylnonacosano)/DB-1	14-methyltriacostano
Pico35	38.726	422	3004	3003(Triacosane)	NT	3003(13-Dimethylnonacosano)/DB-1	15-methyltriacostano
Pico36	39.18	436	3028	NT	NT	3035(14-methyltriacostano)/DB-1	Henriacosano
Pico37	40.592	436	3101	3103(Henriacosane)	3100(Henriacosane)	3100(Henriacosane)/DB-5MS	15-methyltriacostano
Pico38	41.225	450	3128	NT	NT	3130 (15-methyltriacostano)/DB-5	Dotriacosano
Pico39	43.073	450	3204	3202(Dotriacosane)	3200(Dotriacosane)	3200(Dotriacosane)/DB-5	15,16-dimethyldotriacosano
Pico40	46.817	478	-	-	-	-	-

ANEXO II

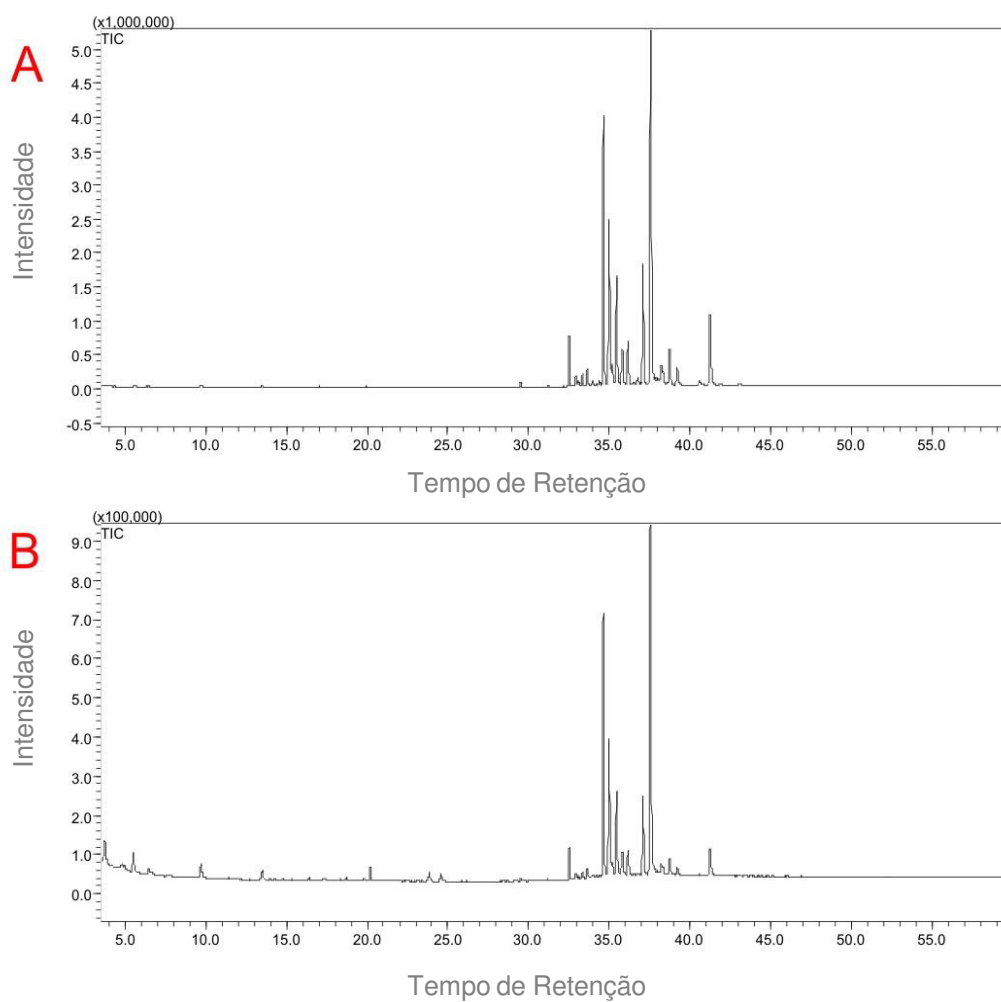
**Cromatogramas de amostras
Extrato Hexânico e Derivatizado**

Colônia A

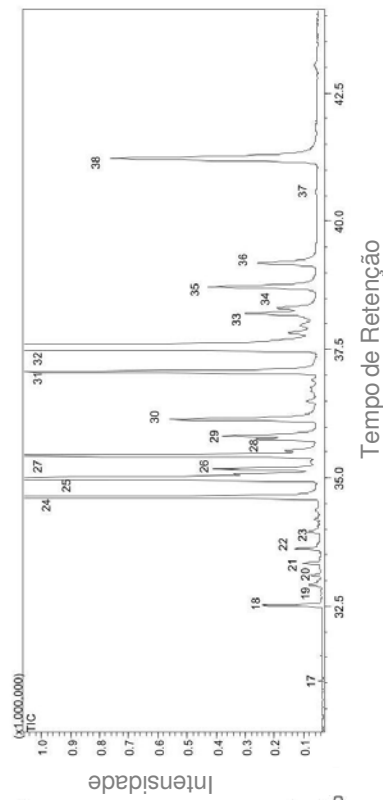
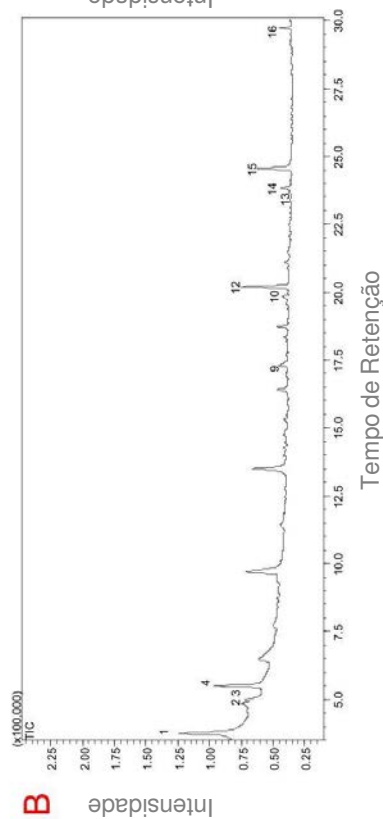
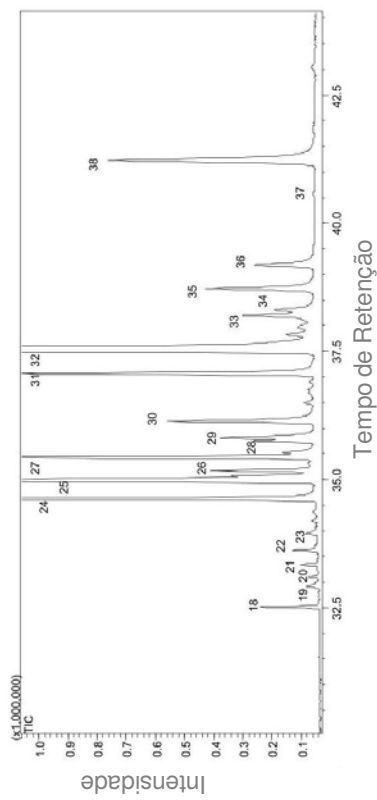
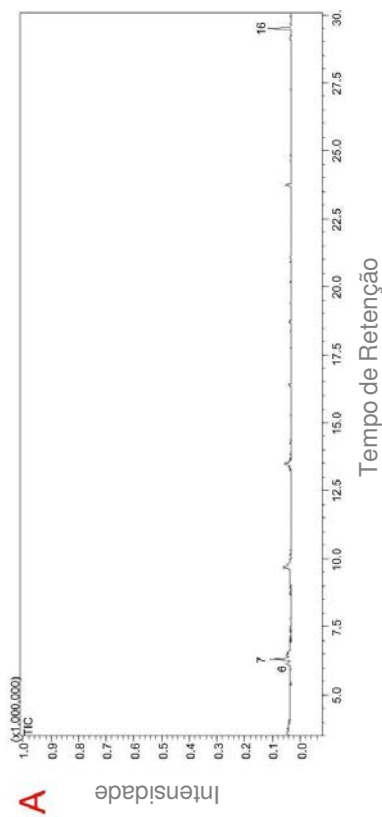
Cromatograma de Íons Totais (TIC), o qual apresenta o somatório da intensidade de sinais de íons em cada um dos espectros de massas de uma série adquirida em função do tempo de retenção em minutos.

Figura A: Cromatograma de íons totais representativo da análise do extrato hexânico do tegumento da vespa *Polybia paulista*, colônia A.

Figura B: Cromatograma de íons totais representativo da análise do extrato derivatizado do tegumento da vespa *Polybia paulista*, colônia A.



Cromatograma de íons totais representativo do extrato hexânico(A) e extrato derivatizado (B) do tegumento da vespa *Polypbia patista*, colônia A, com picos cromatográficos numerados segundo sua identificação na tabela 1. 1: decano, 2: 2-metildecano, 3: 3-metildecano, 4: undecano, 9: ácido tetradecanoico, 10: ácido 9-hexadecenoico, 12: ácido hexadecanoico, 13: 4-metilnonadecano, 14: ácido 11-ocatenoico, 15: ácido octadecenoico, 16:tricosano, 17: tetracosano, 18: pentacosano, 19: 11-metiltetracosano, 20: 2,19-dimetilttricosano, 21: 3-metiltetracosano, 22: hexacosano, 23: 13-metilhexacosano, 24: heptacosano, 25: 2-metilheptacosano, 26: 5,22-dimetilhexacosano, 27: 3-metilheptacosano, 29: 10,11-dimetilheptacosano, 30: 10,14-dimetilheptacosano, 31: nonacosano, 32: 13,14-dimetiloctacosano, 33: 3,10-dimetiloctacosano, 34: 4-metilnonacosano, 35: 13-metilnonacosano, 36: 14-metiltriacontano, 37: hentriacontano, 38: 15-metilhentriacontano, 39: dotriacontano.

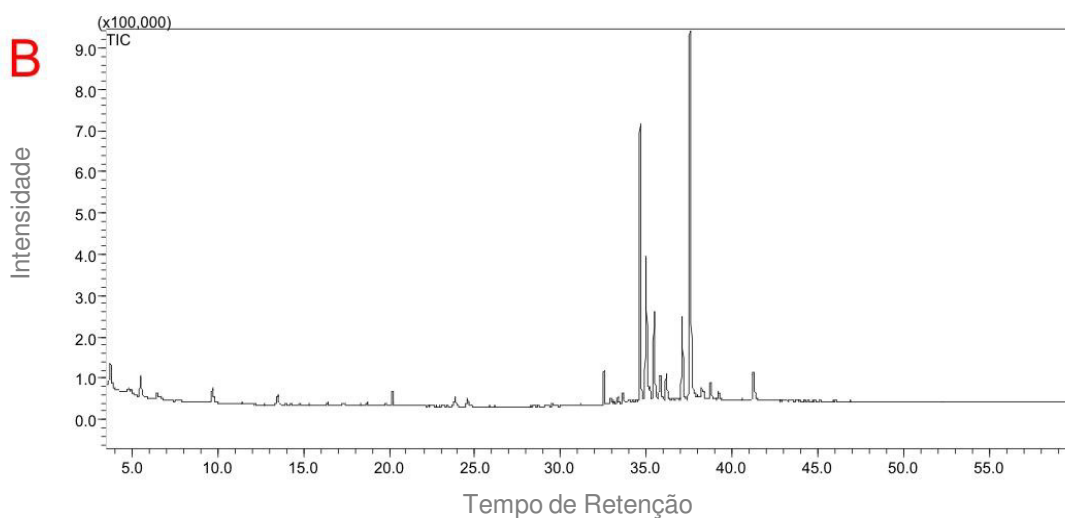
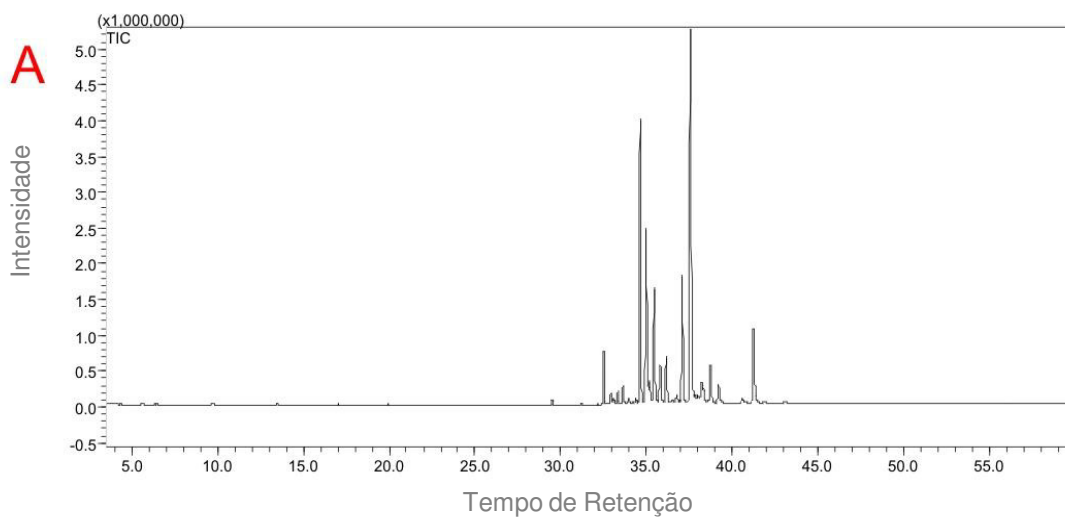


Colônia B

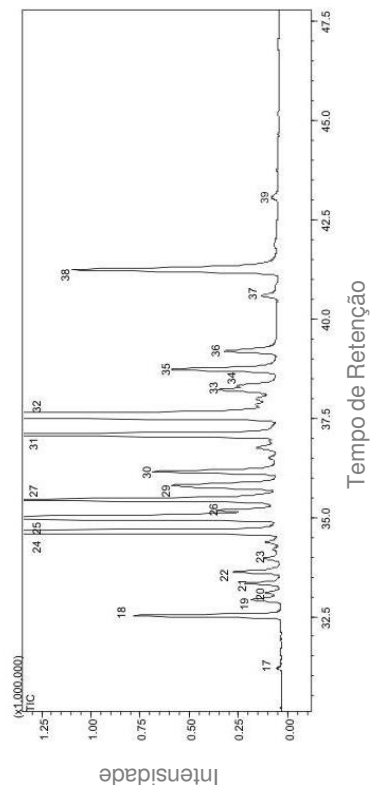
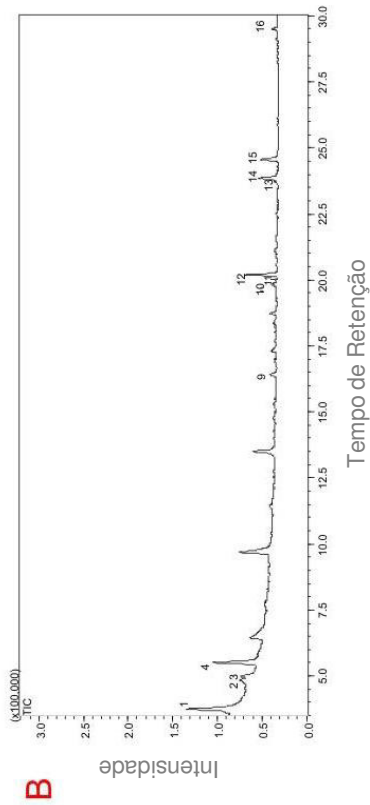
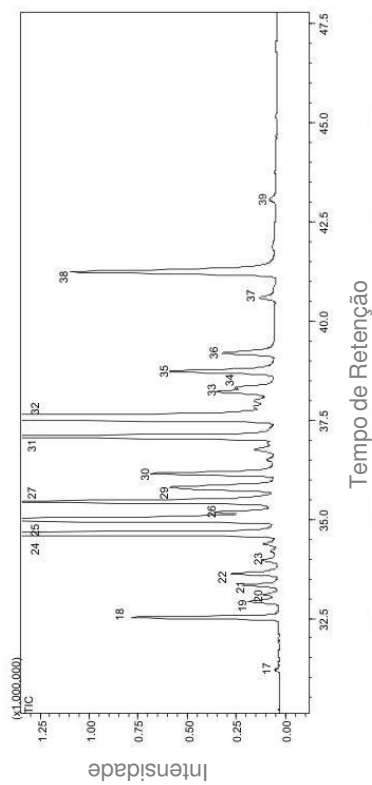
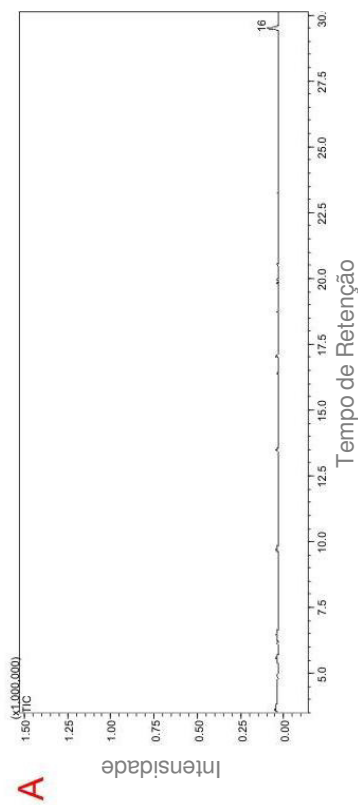
Cromatograma de Íons Totais (TIC), o qual apresenta o somatório da intensidade de sinais de íons em cada um dos espectros de massas de uma série adquirida em função do tempo de retenção em minutos.

Figura A: Cromatograma de íons totais representativo da análise do extrato hexânico do tegumento da vespa *Polybia paulista*, colônia B

Figura B: Cromatograma de íons totais representativo da análise do extrato derivatizado do tegumento da vespa *Polybia paulista*, colônia B.



Cromatograma de íons totais representativo do extrato hexânico(A) e extrato derivatizado (B) do tegumento da vespa *Polybia patrista*, colônia B, com picos cromatográficos numerados segundo sua identificação na tabela 1. 1: decano, 2: 2-metilnonan-5-ona, 3: 3-metildecano, 4: undecano, 9: ácido tetradecanoico, 10: ácido 9-hexadecenoico, 12: ácido hexadecanoico, 13: 4-metilnonadecano, 14: ácido 11-ocatenoico, 15: ácido octadecenoico, 16:tricosano, 17: tetracosano, 18: pentacosano, 19: 11-metiltricosano, 20: 2,19-dimetiltricosano, 21: 3-metiltricosano, 22: hexacosano, 23: 13-metilhexacosano, 24: heptacosano, 25: 2-metilheptacosano, 26: 5,22-dimetilhexacosano, 27: 3-metilheptacosano, 29: 10,11-dimetilheptacosano, 30: 10,14-dimetilheptacosano, 31: nonacosano, 32: 13,14-dimetilocosano, 33: 3,10-dimetilocosano, 34: 4-metilnocosano, 35: 13-metilnocosano, 36: 14-metiltricosano, 37: hentriacosano, 38: 15-metilhentriacosano, 39: dotriacontano.



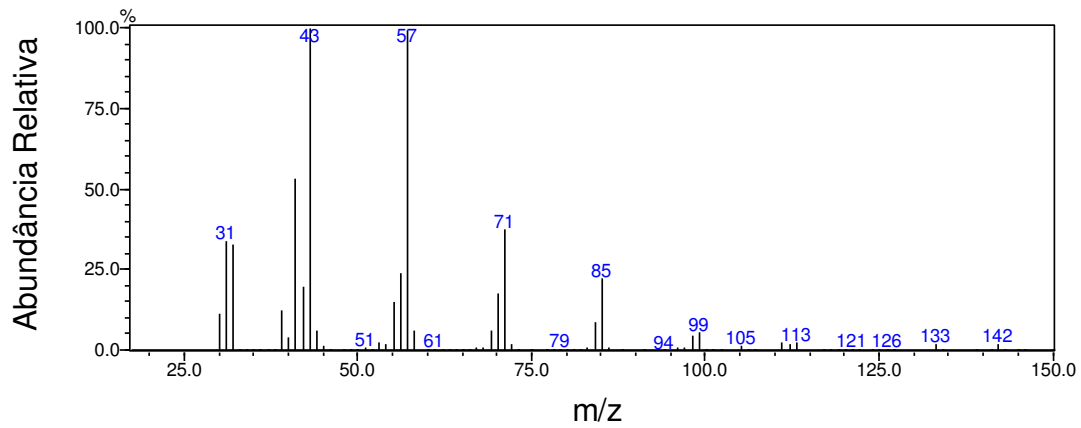
ANEXO III**Espectros de Massas dos Compostos Identificados**

Pico1

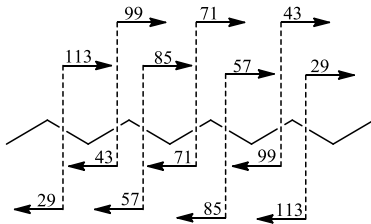
m/z: 142

Nome: Decane

Espectro:



Fragmentação Manual:

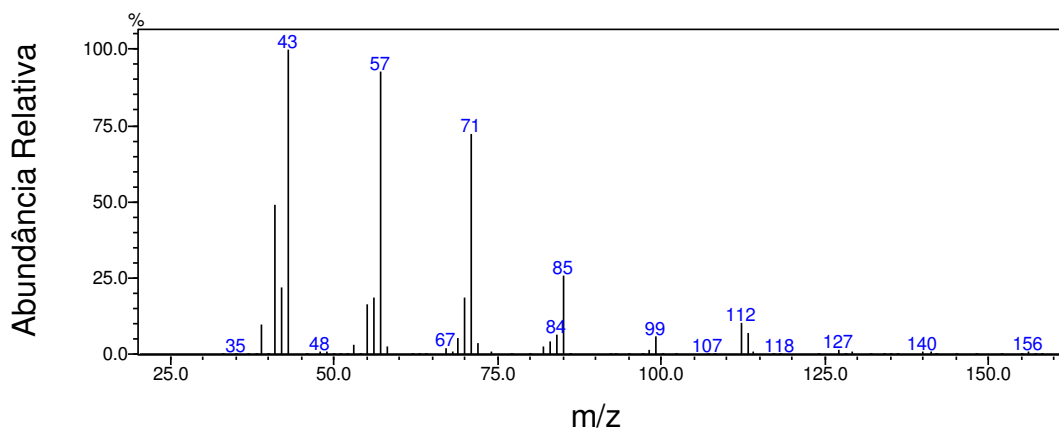


Pico 2

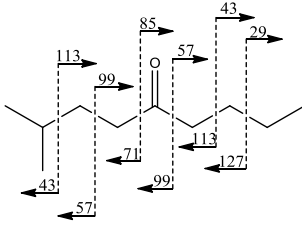
m/z: 156

Nome: 2-methylnonan-5-one

Espectro:



Fragmentação Manual:

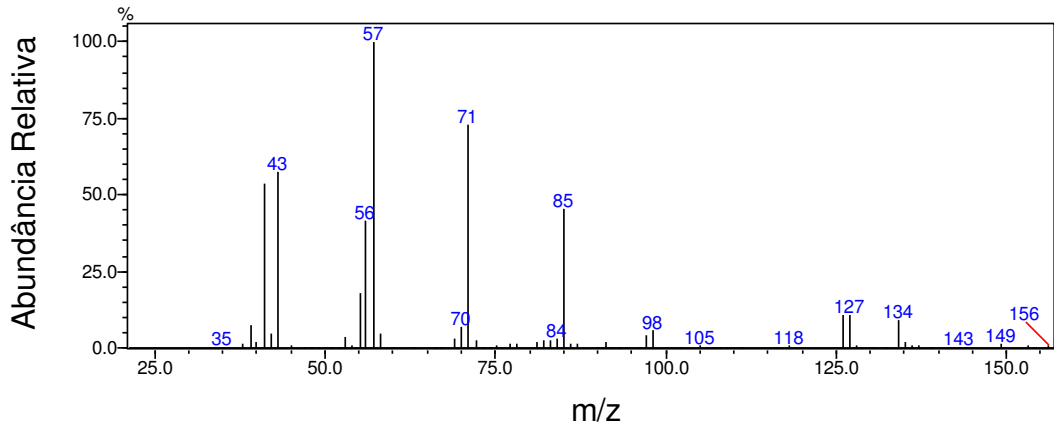


Pico 3

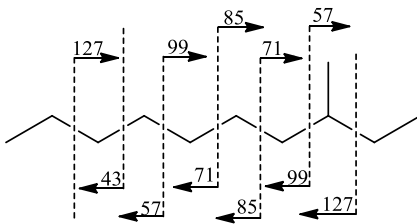
m/z: 156

Nome: 3-methyldecane

Espectro:



Fragmentação Manual

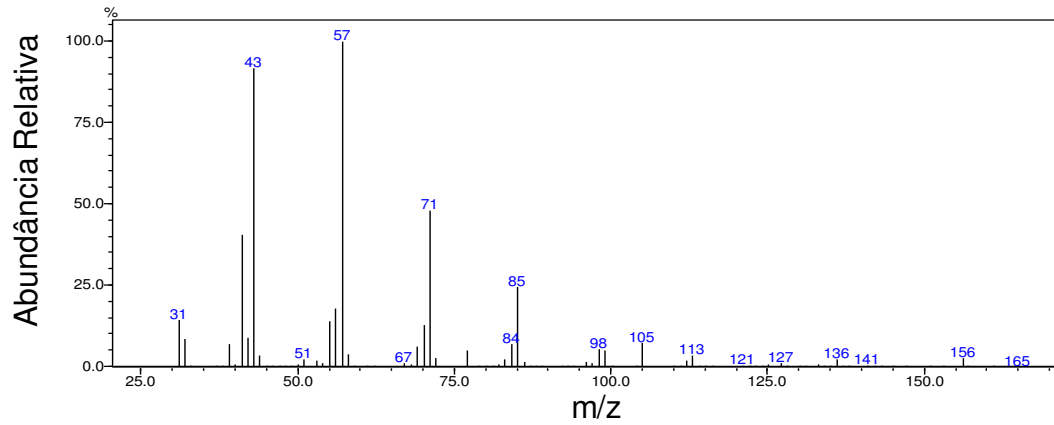


Pico 4

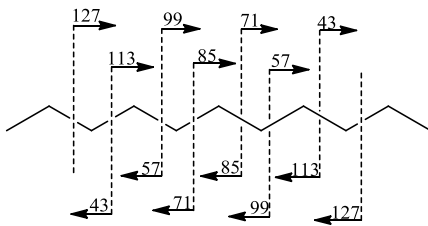
m/z:156

Nome: Undecane

Espectro:



Fragmentação manual

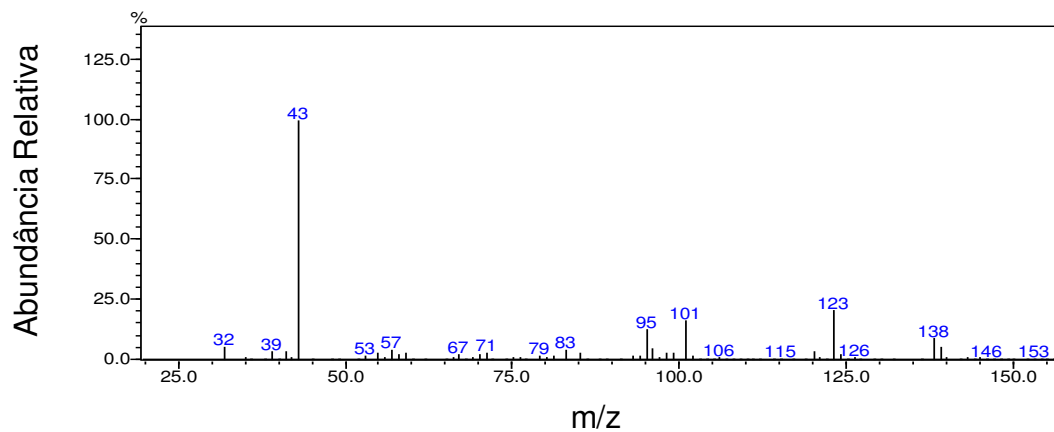


Pico 5

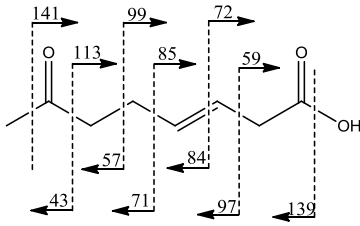
m/z:156

Nome: (E)-7-oxooct-3-enoic acid

Espectro:



Fragmentação Manual

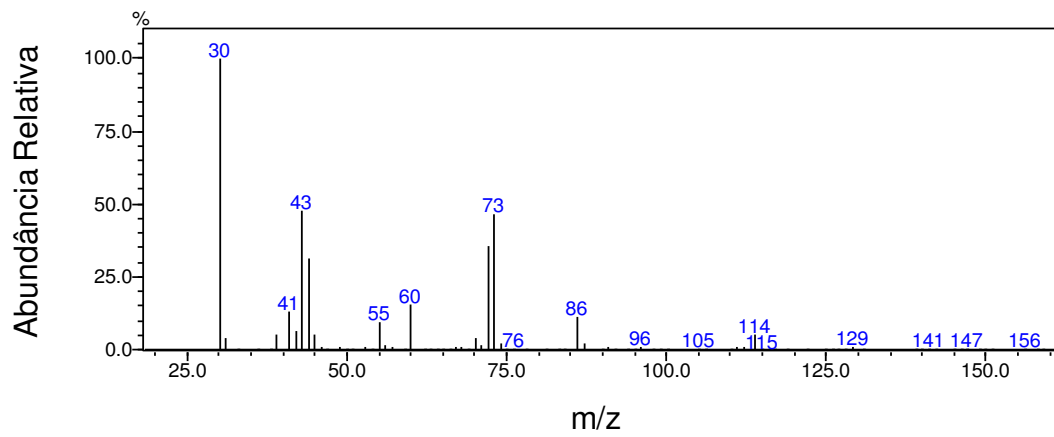


Pico 6

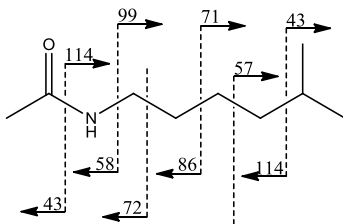
m/z:157

Nome: N-(5-methylhexyl)acetamide

Espectro:



Fragmentação Manual

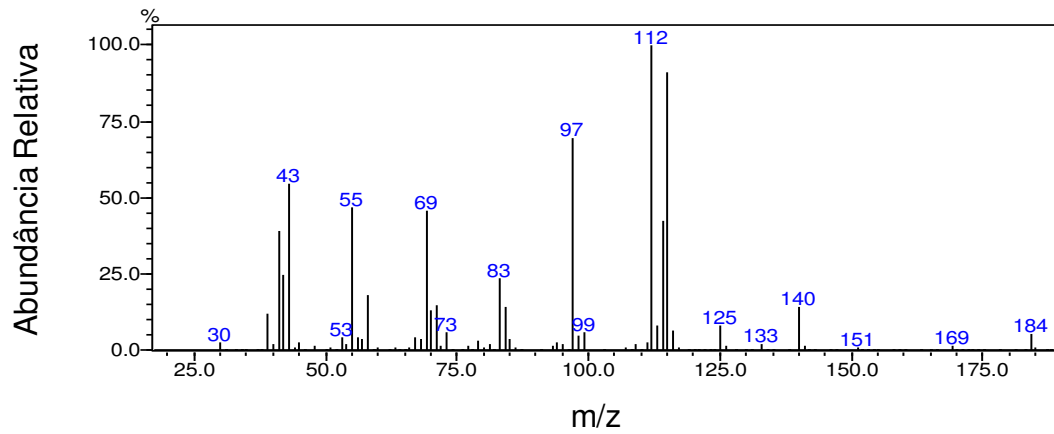


Pico 7

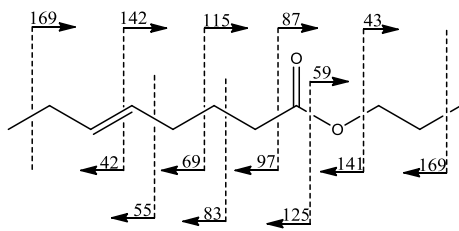
m/z:184

Nome: (E)-propyl oct-5-enoate

Espectro:



Fragmentação Manual



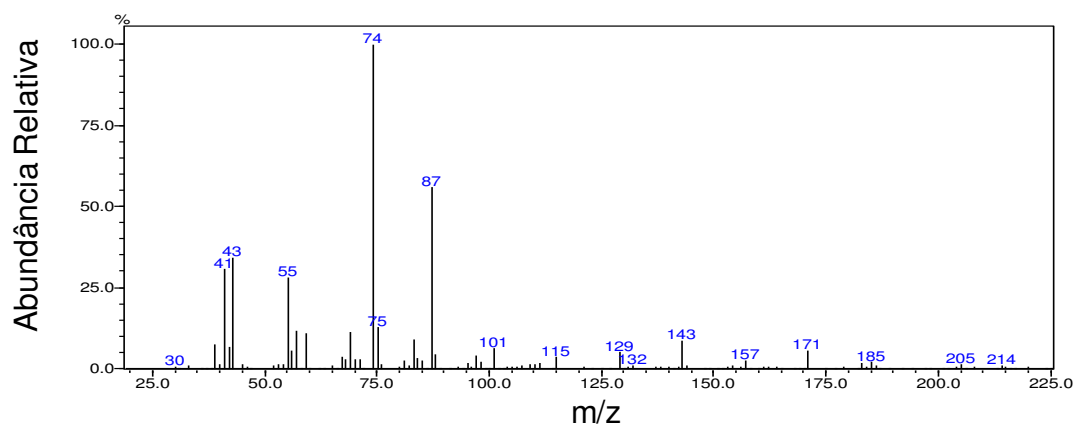
Fragmentos internos: 30, 43, 55, 58, 109, 112, 114, 140

Pico 8

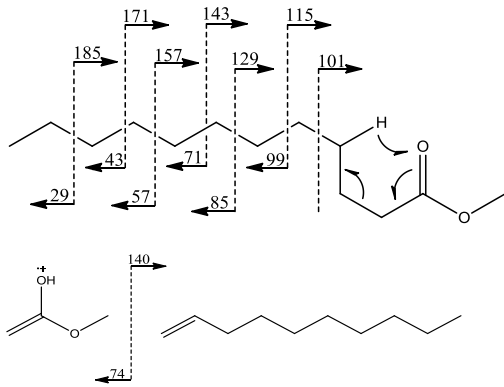
m/z:214

Nome: Dodecanoic acid(Lauric acid)

Espectro:



Fragmentação Manual

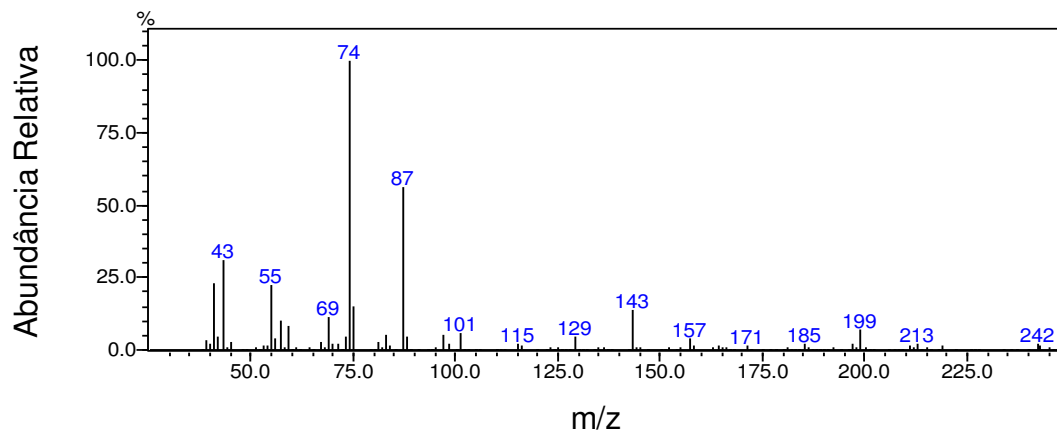


Pico 9

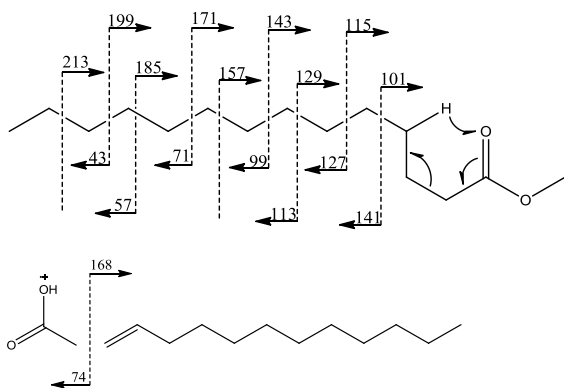
m/z:242

Nome: Tetradecanoic acid

Espectro:



Fragmentação Manual

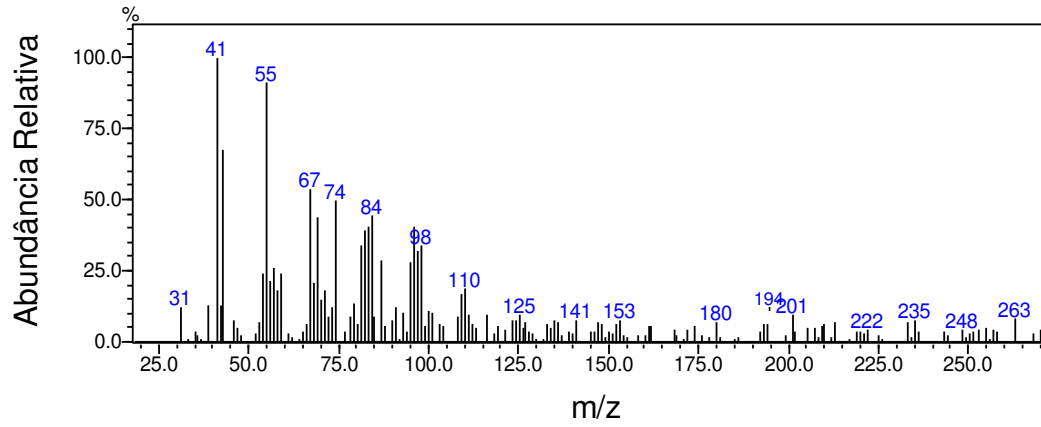


Pico 10

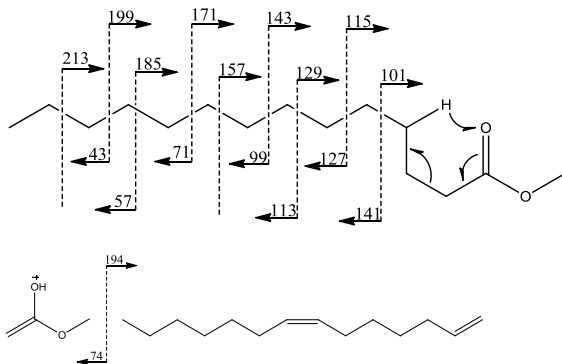
m/z:268

Nome: 9-Hexadecenoic acid

Espectro:



Fragmentação Manual

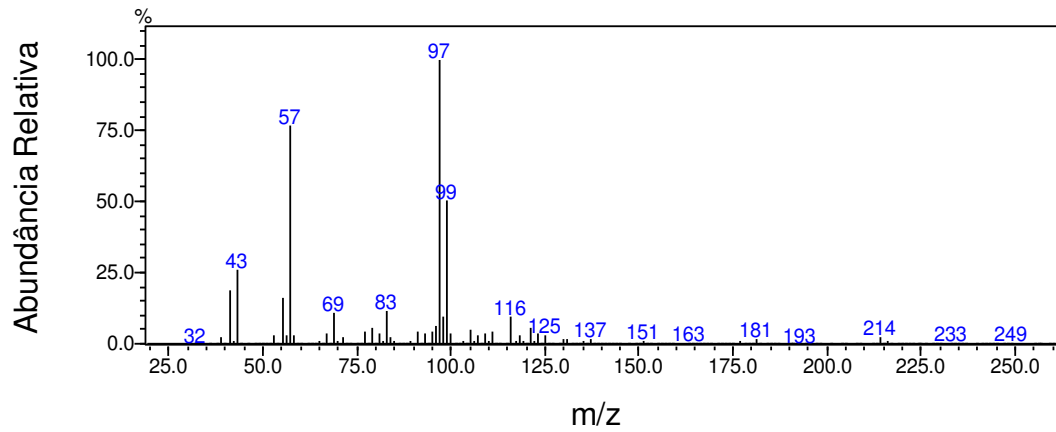


Pico 11

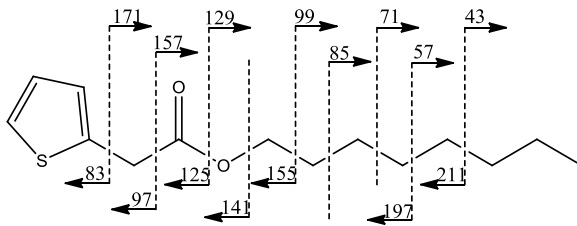
m/z:254

Nome: octyl 2-(thiophen-2-yl)acetate

Espectro:



Fragmentação Manual

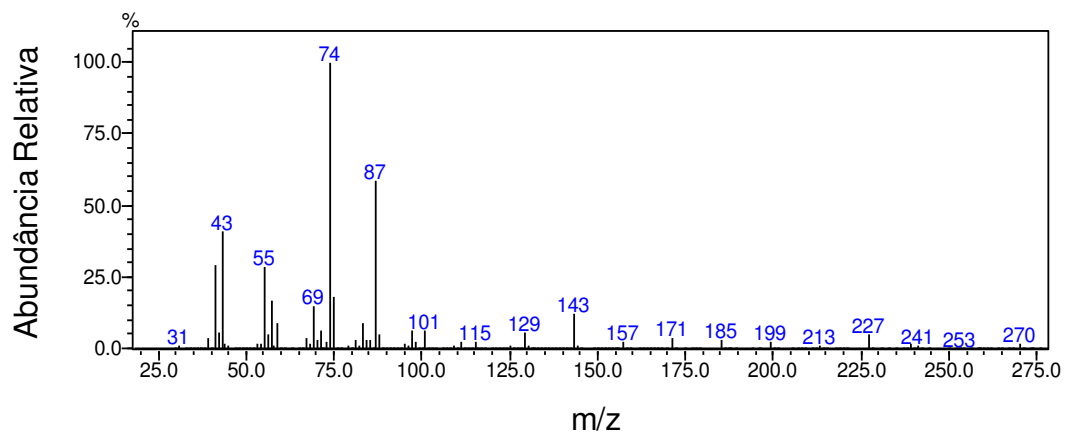


Pico12

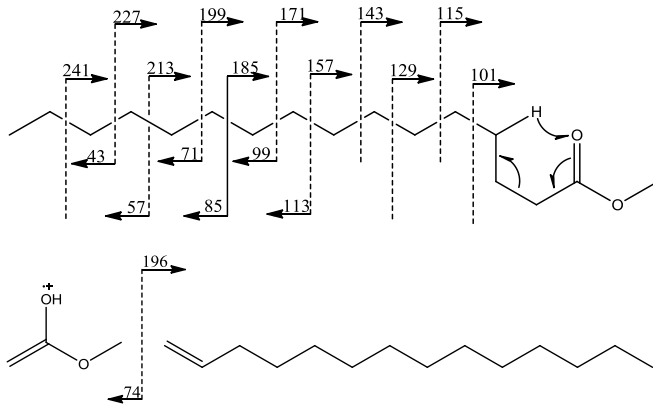
m/z:256

Nome: Palmitic acid

Espectro:



Fragmentação Manual

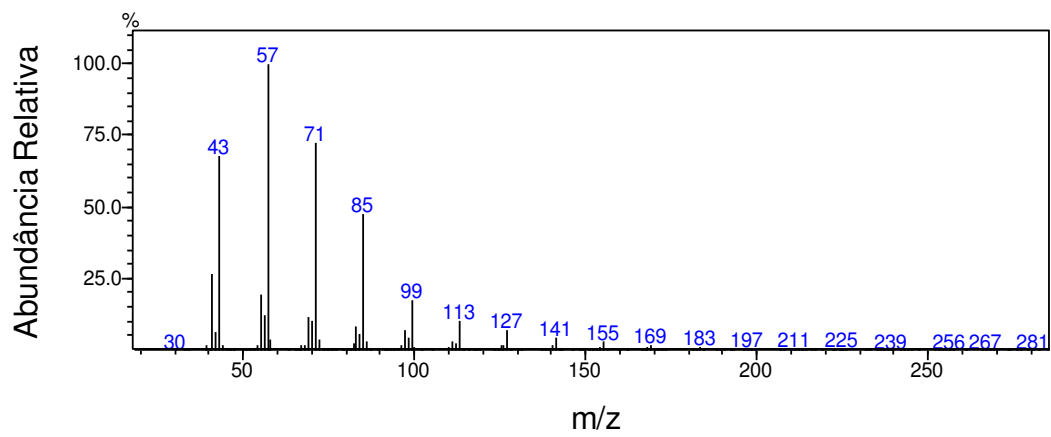


Pico13

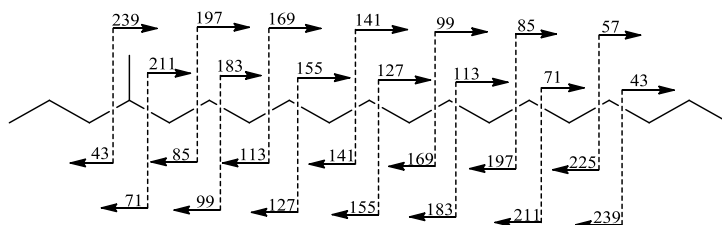
m/z:282

Nome: 4-methylnonadecane

Espectro:



Fragmentação Manual

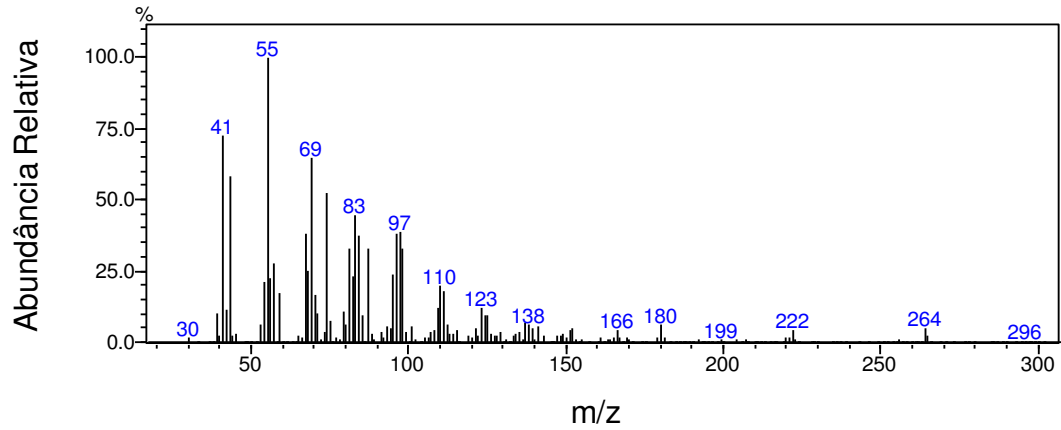


Pico14

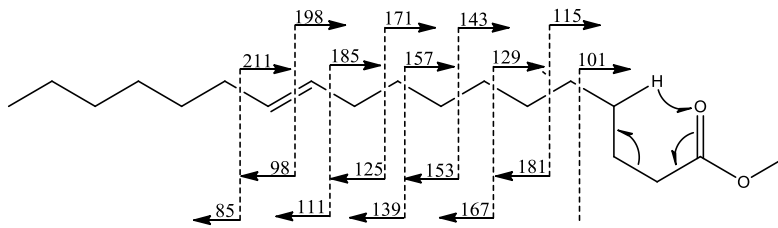
m/z:282

Nome: 11-Octadecenoic acid

Espectro:



Fragmentação manual

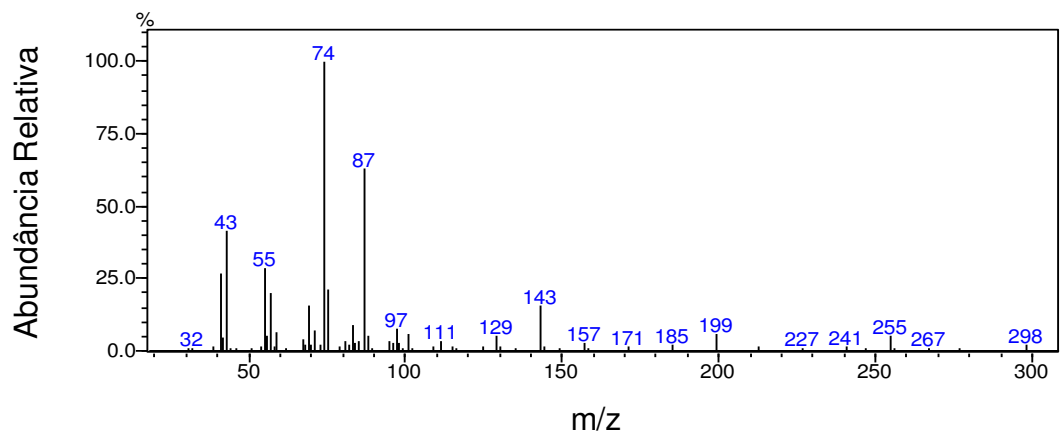


Pico 15

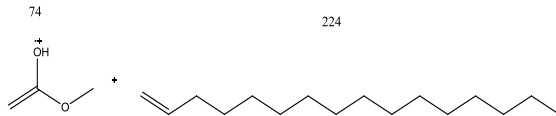
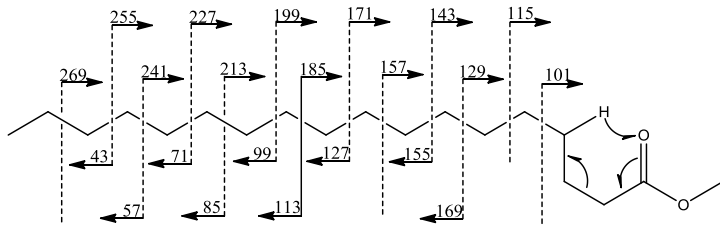
m/z:284

Nome: Stearic acid

Espectro:



Fragmentação Manual

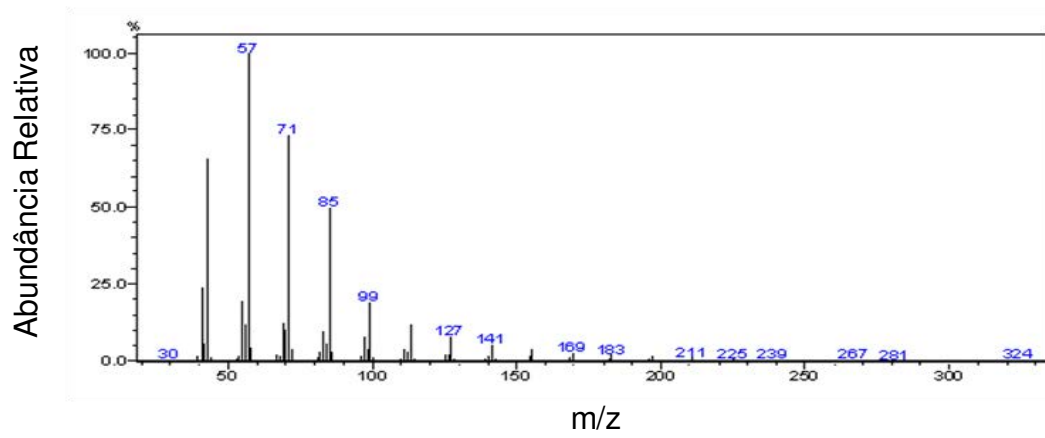


Pico16

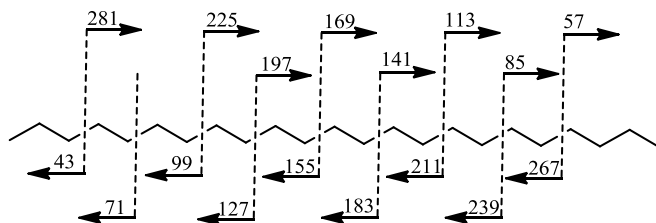
m/z:324

Nome:Tricosane

Espectro:



Fragmentação Manual

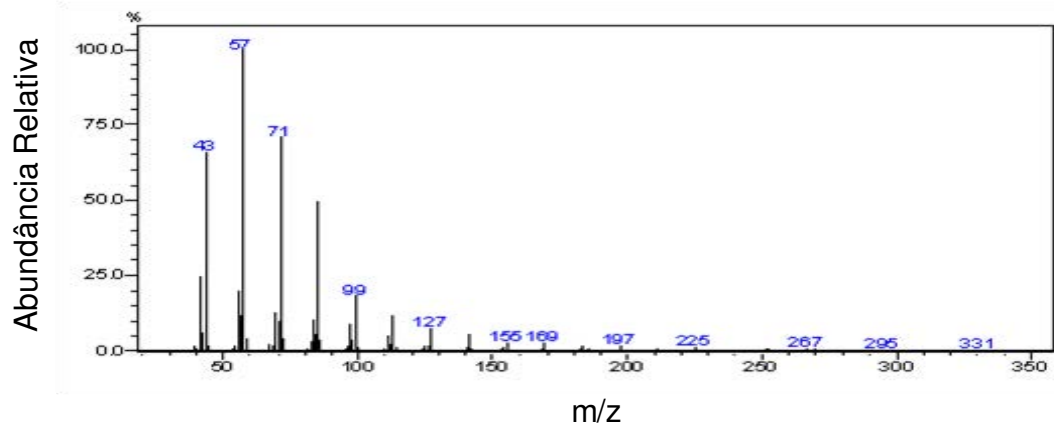


Pico17

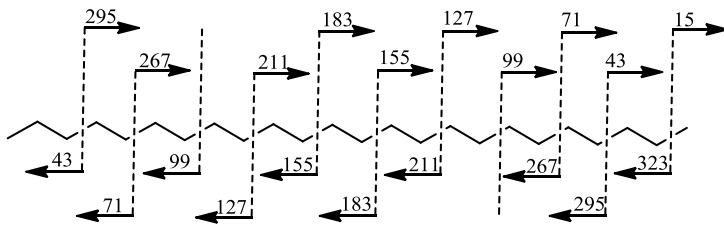
m/z:338

Nome: Tetracosane

Espectro:



Fragmentação Manual

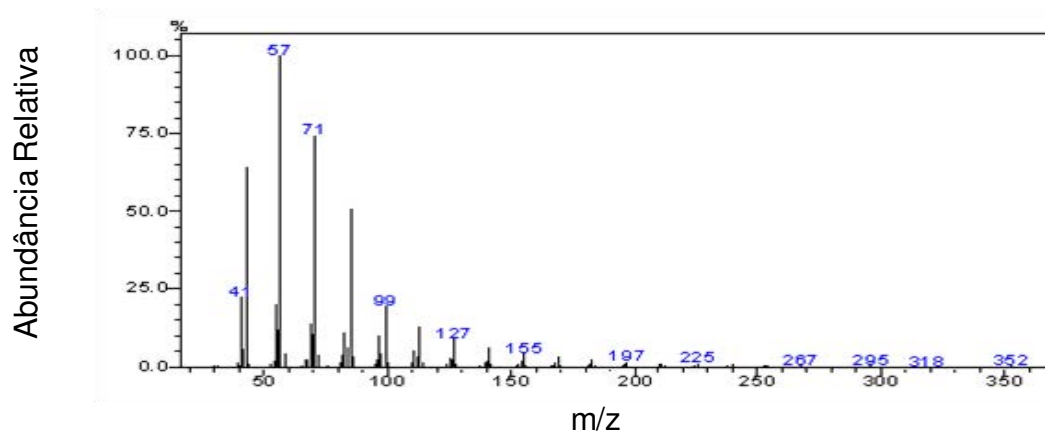


Pico 18

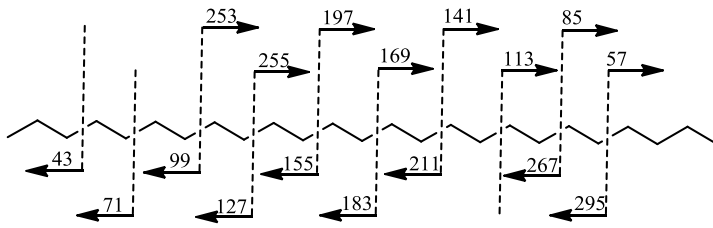
m/z:352

Nome: Pentacosane

Espectro:



Fragmentação Manual

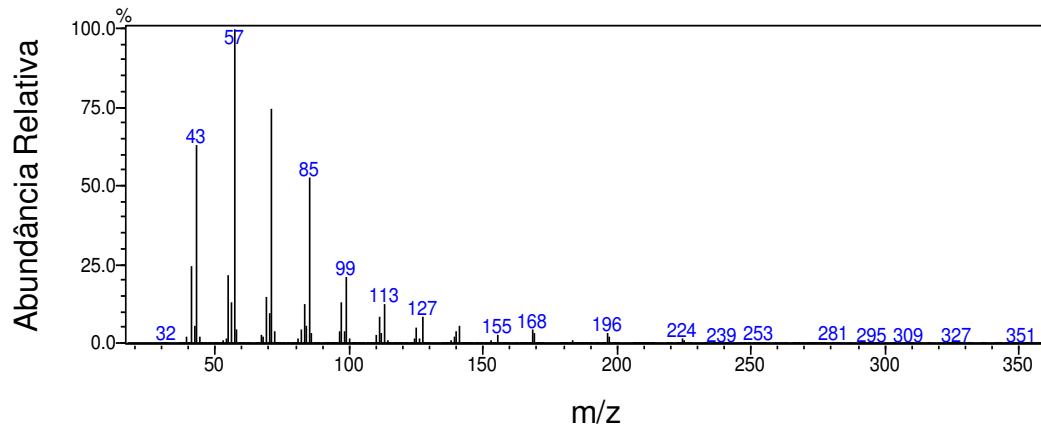


Pico 19

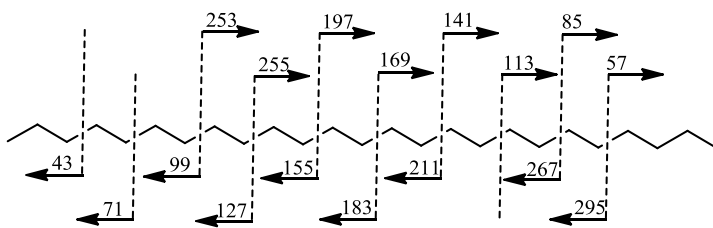
m/z:352

Nome: 11-Methyltetracosane

Espectro:



Fragmentação Manual

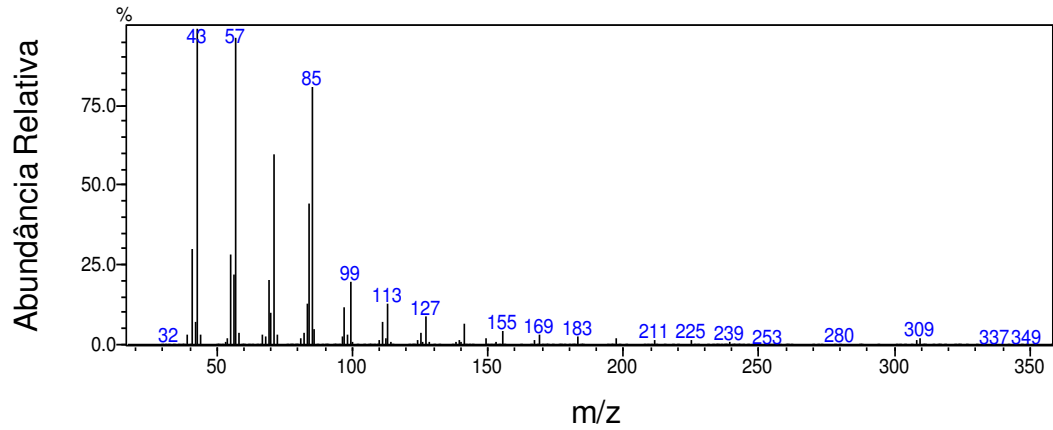


Pico 20

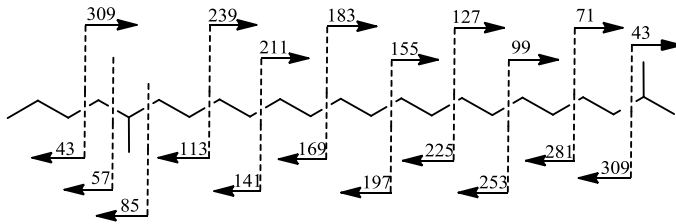
m/z:352

Nome: 2,19-dimethyltricosane

Espectro:



Fragmentação Manual

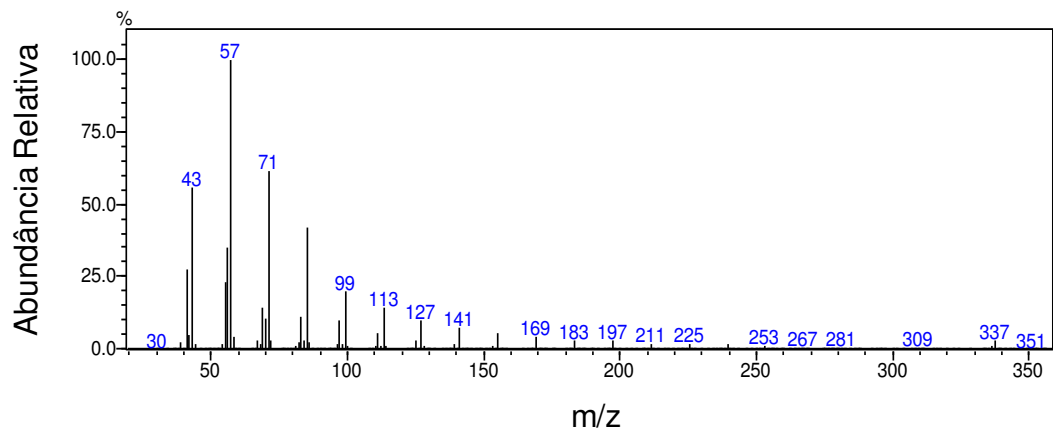


Pico 21

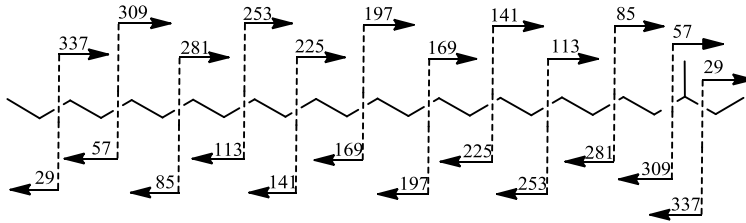
m/z:366

Nome: 3-methylpentacosane

Espectro:



Fragmentação Manual

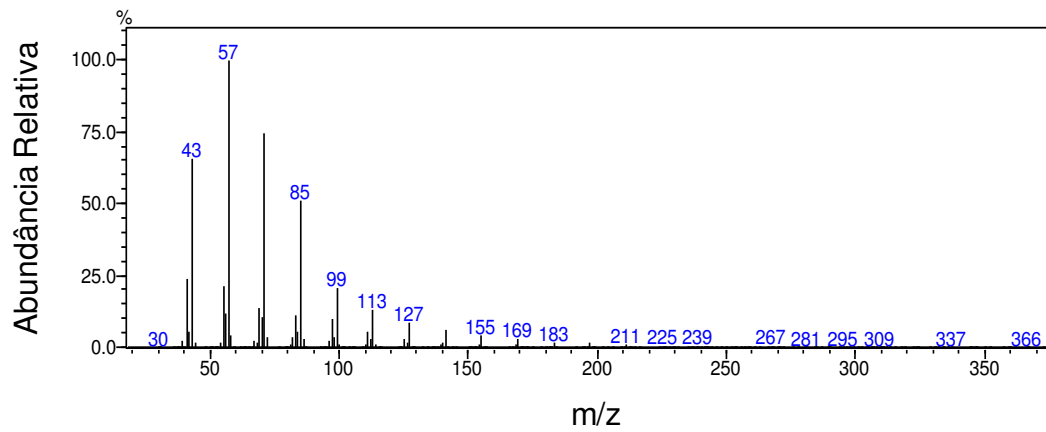


Pico 22

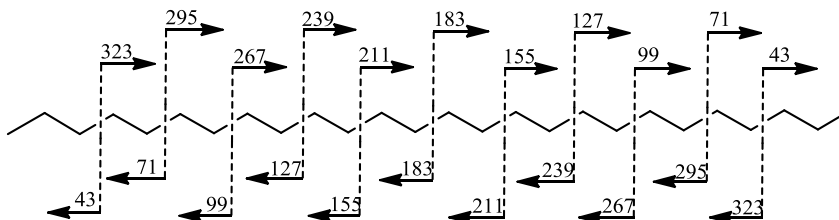
m/z:366

Nome: Hexacosane

Espectro:



Fragmentação Manual

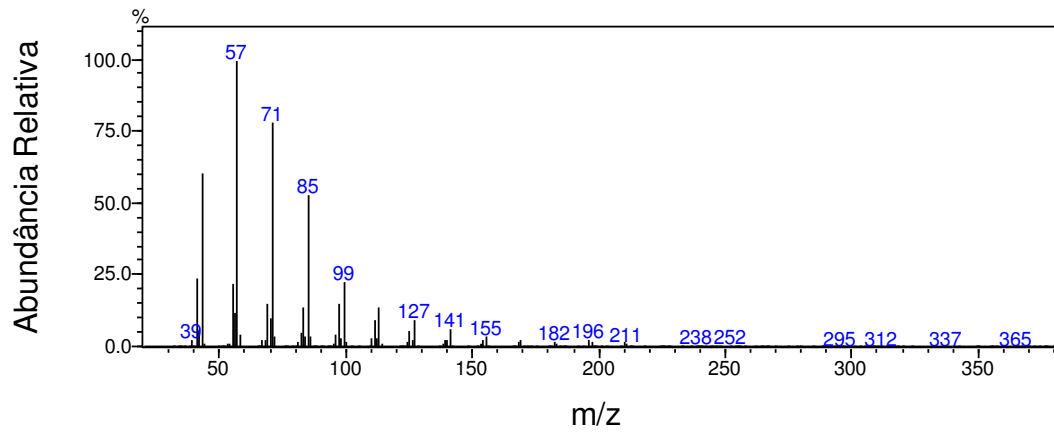


Pico 23

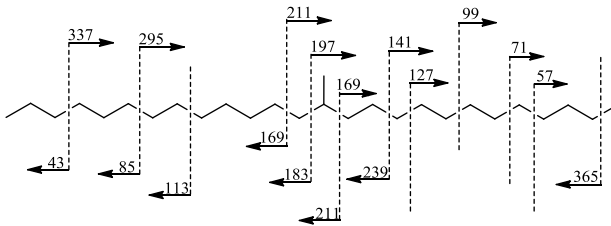
m/z:380

Nome: 13-Methylhexacosane

Espectro:



Fragmentação Manual

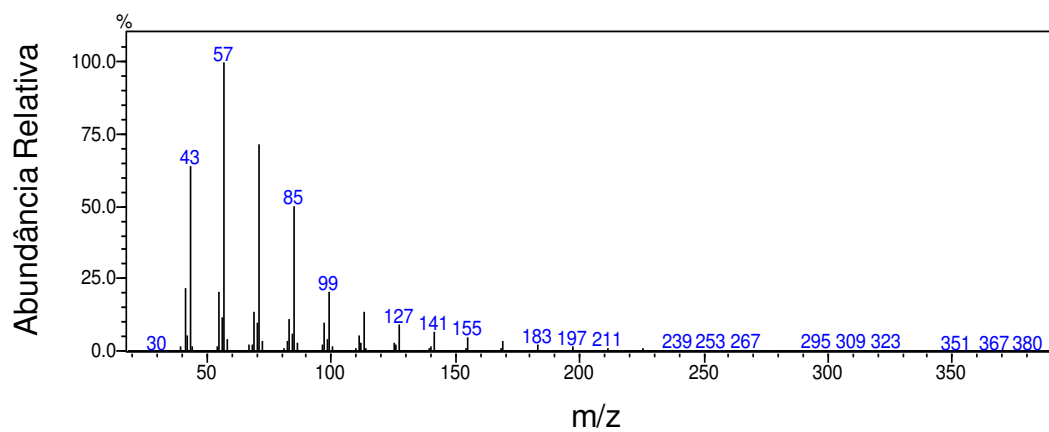


Pico 24

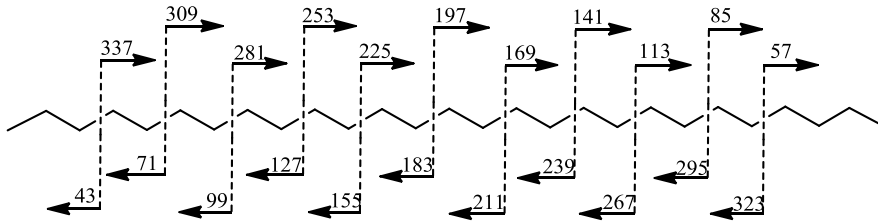
m/z:380

Nome: Heptacosane

Espectro:



Fragmentação Manual

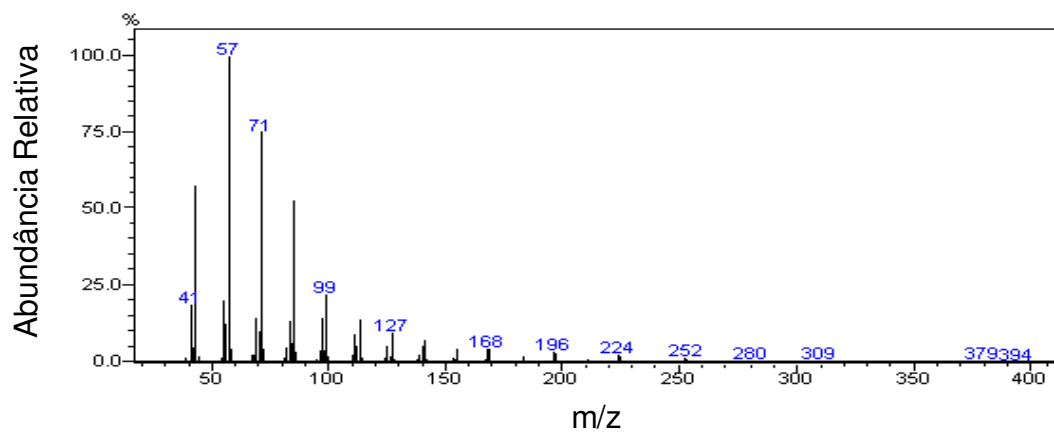


Pico 25

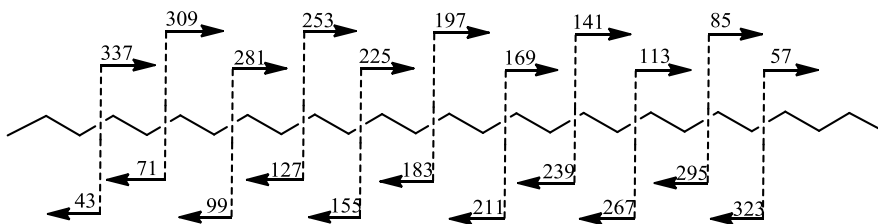
m/z:394

Nome: 2-Methylheptacosane

Espectro:



Fragmentação Manual

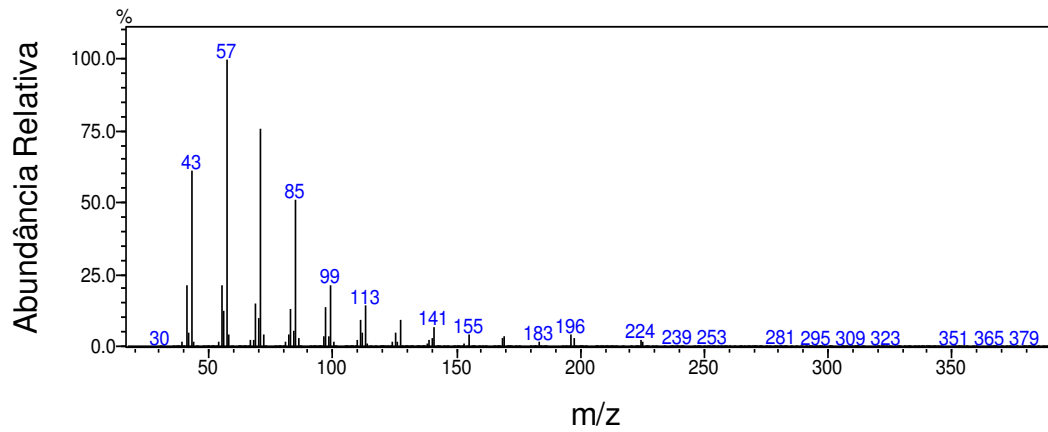


Pico 26

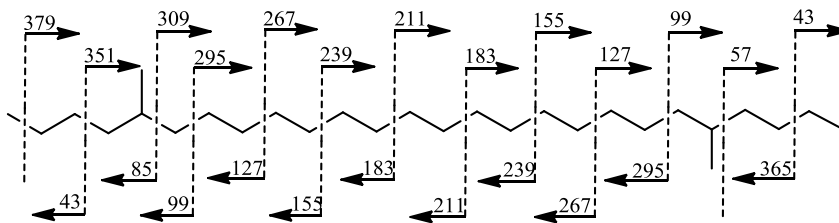
m/z:394

Nome: 5,22-dimethylhexacosane

Espectro:



Fragmentação Manual

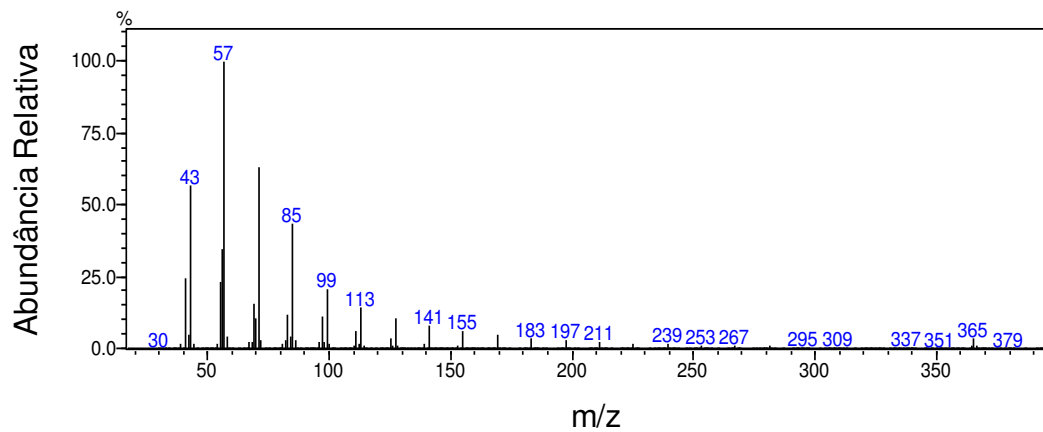


Pico 27

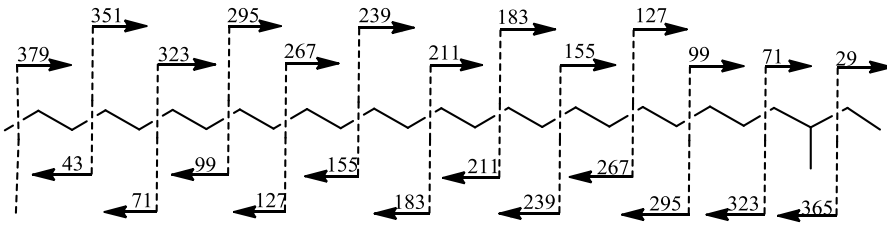
m/z:394

Nome: 3-methylheptacosane

Espectro:



Fragmentação Manual

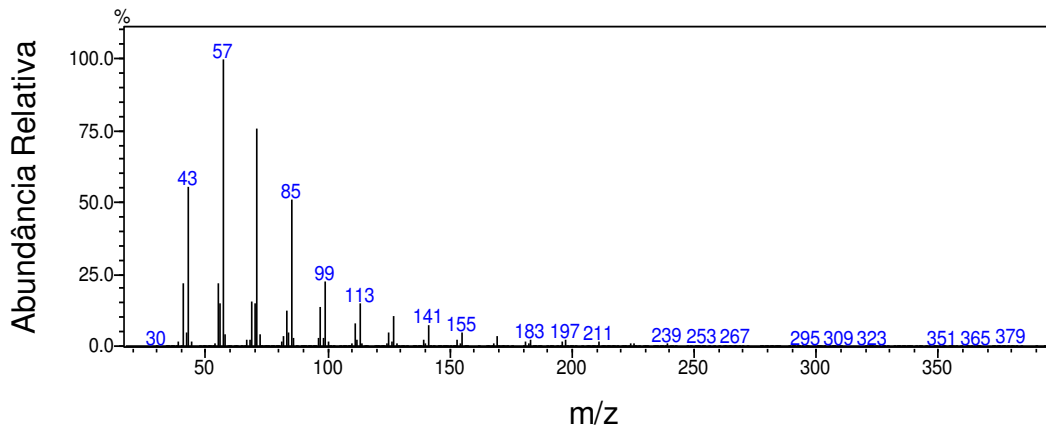


Pico 28

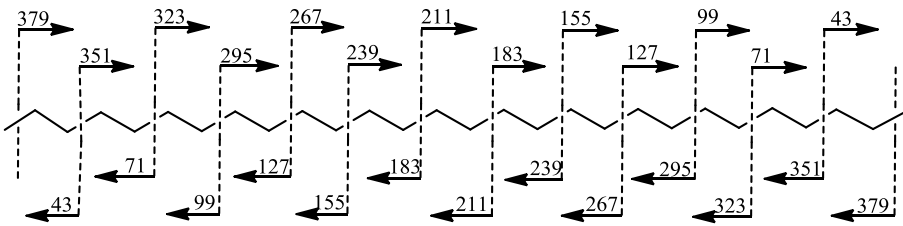
m/z:394

Nome: Octacosane

Espectro:



Fragmentação Manual

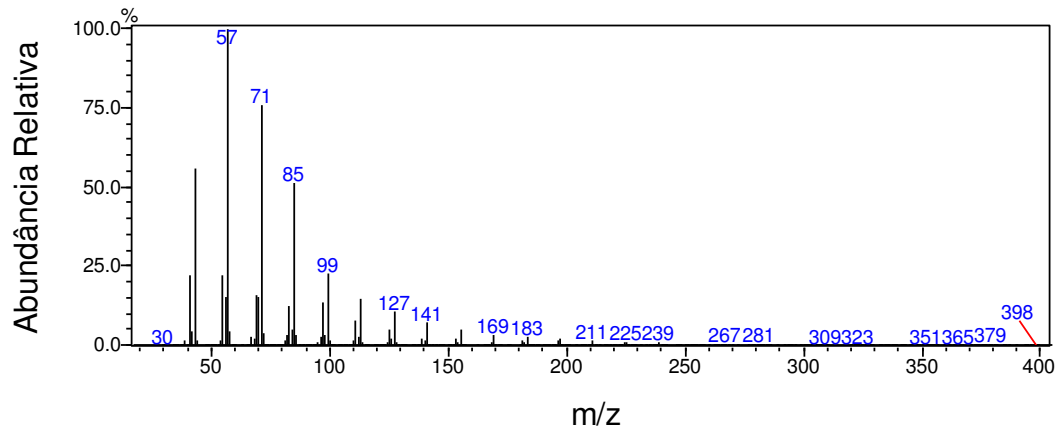


Pico 29

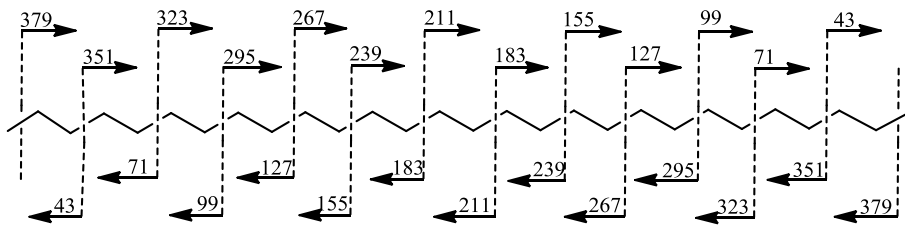
m/z: 408

nome: 10,11-Dimethylheptacosane

Espectro:



Fragmentação Manual

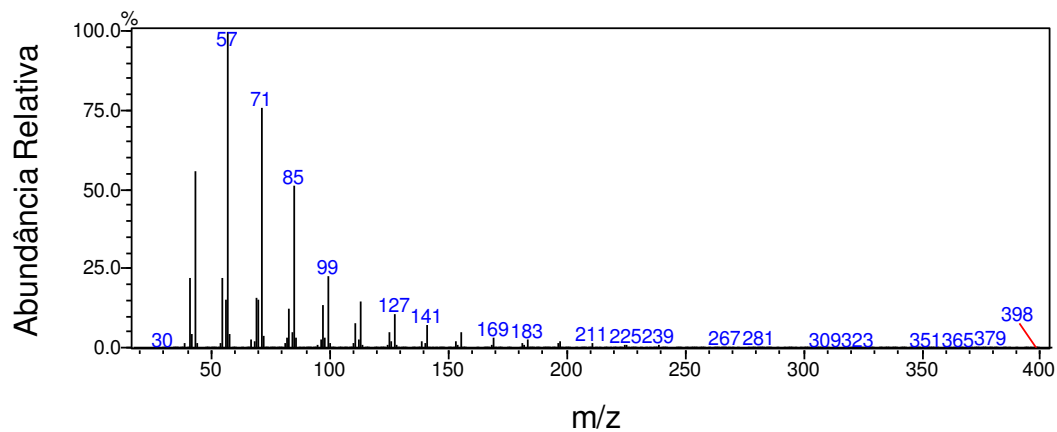


Pico 30

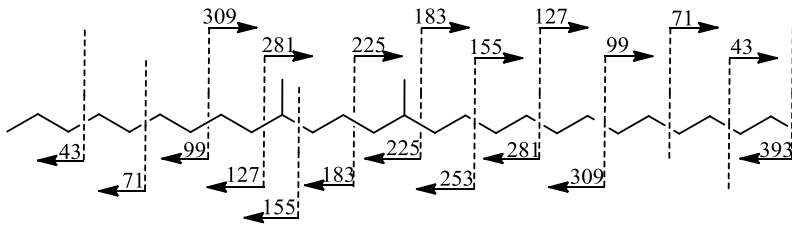
m/z: 408

nome: 10,14-dimethylheptacosane

Espectro



Fragmentação Manual

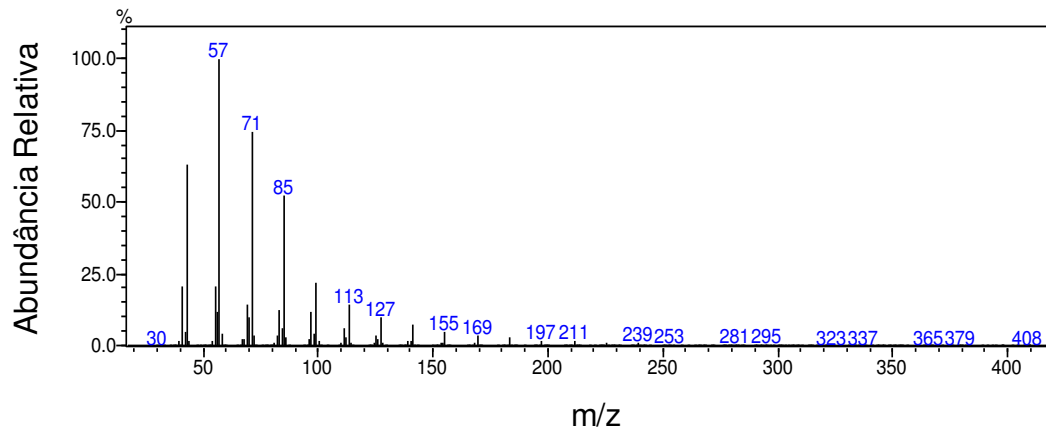


Pico 31

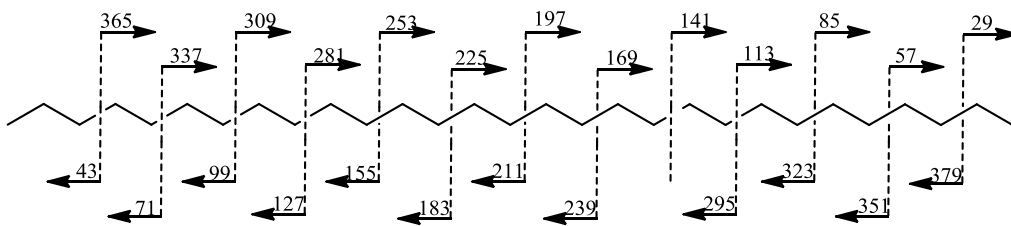
m/z:408

Nome: Nonacosane

Espectro:



Fragmentação Manual

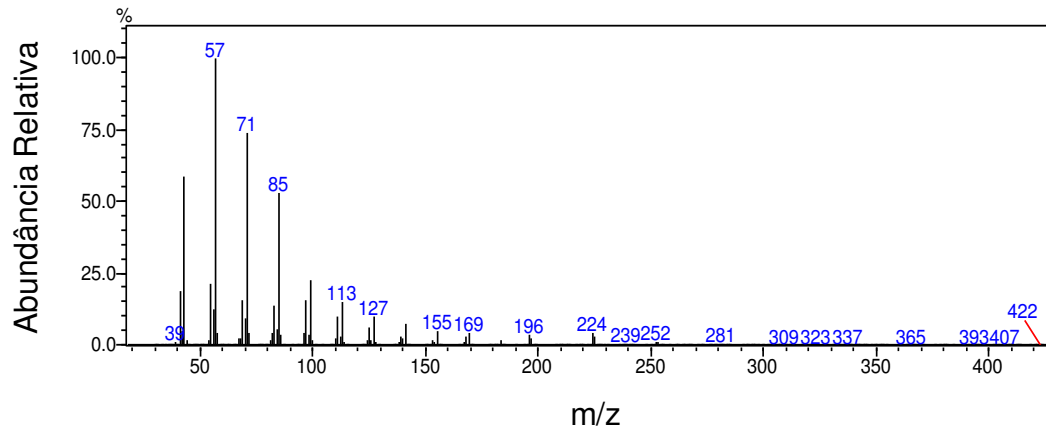


Pico 32

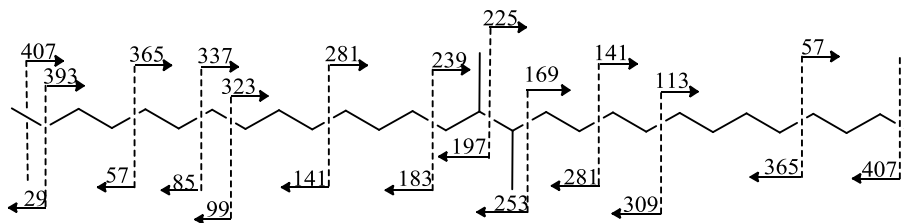
m/z:422

Nome:

Espectro:



Fragmentação Manual

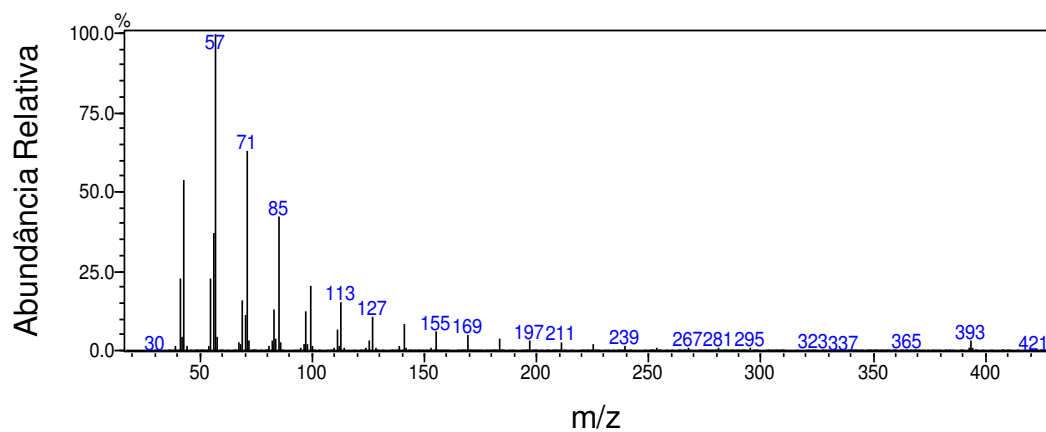


Pico 33

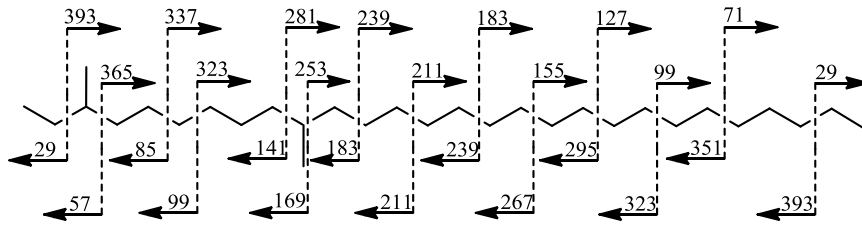
m/z:422

Nome: 3,10-dimethyloctacosane

Espectro:



Fragmentação Manual

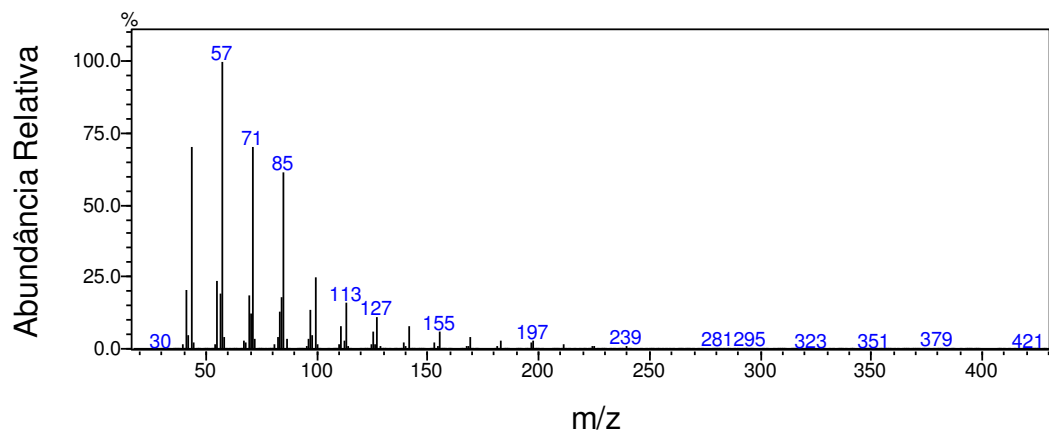


Pico 34

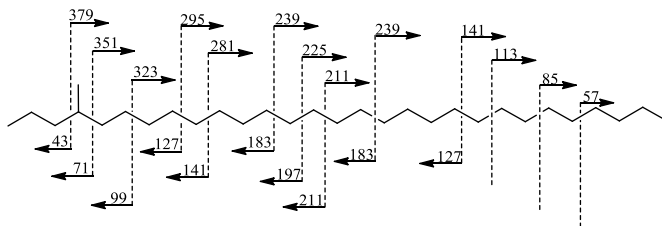
m/z:422

Nome:4-methylnonacosane

Espectro:



Fragmentação Manual

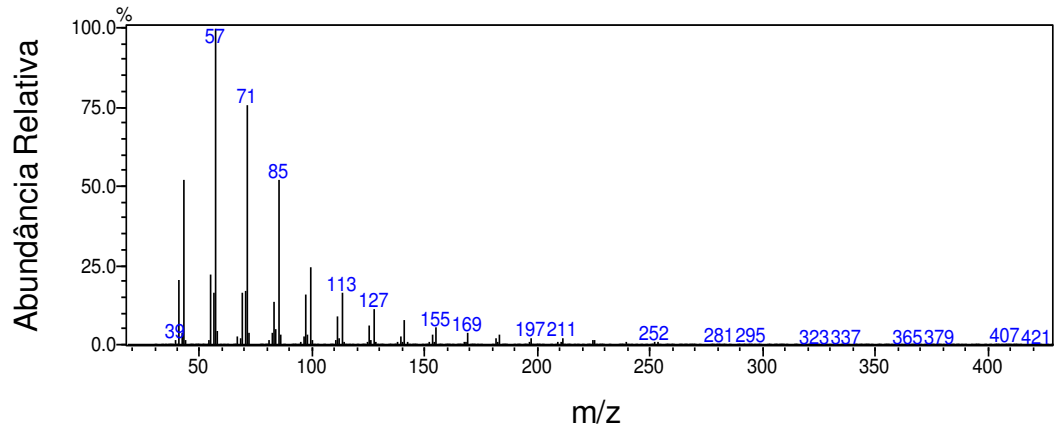


Pico 35

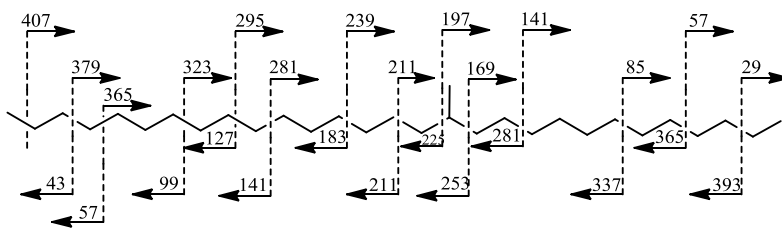
m/z:422

Nome: 13-methylnonacosane

Espectro:



Fragmentação Manual

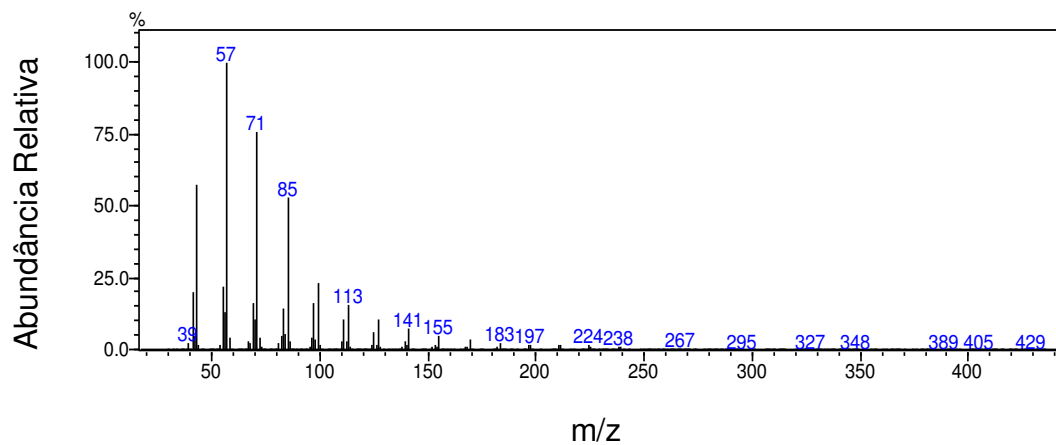


Pico 36

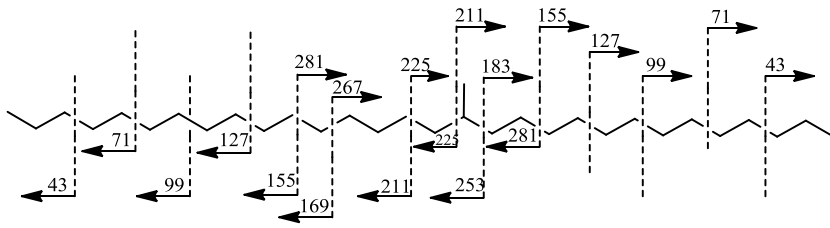
m/z:436

Nome: 14-methyltriacontane

Espectro



Fragmentação Manual

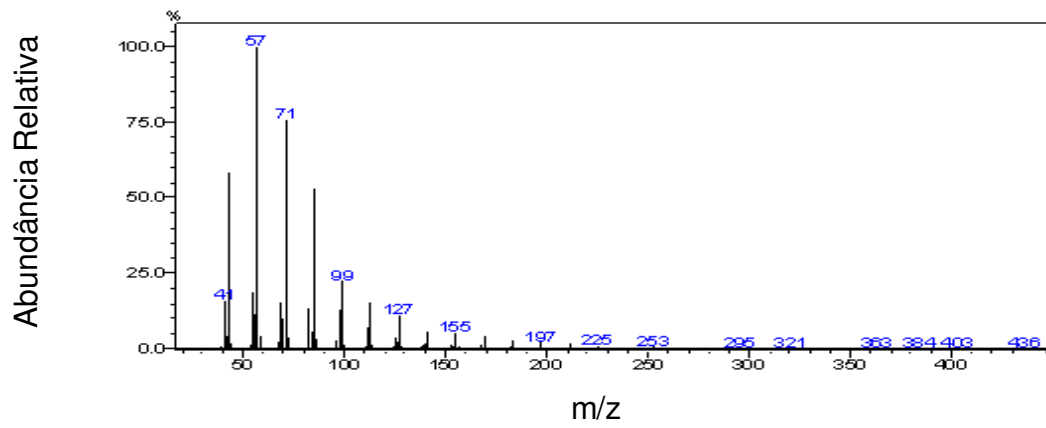


Pico 37

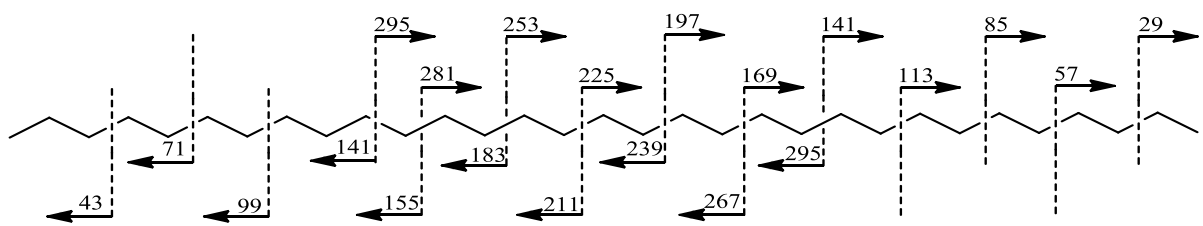
m/z:436

Nome: Hentriacontane

Espectro:



Fragmentação Manual

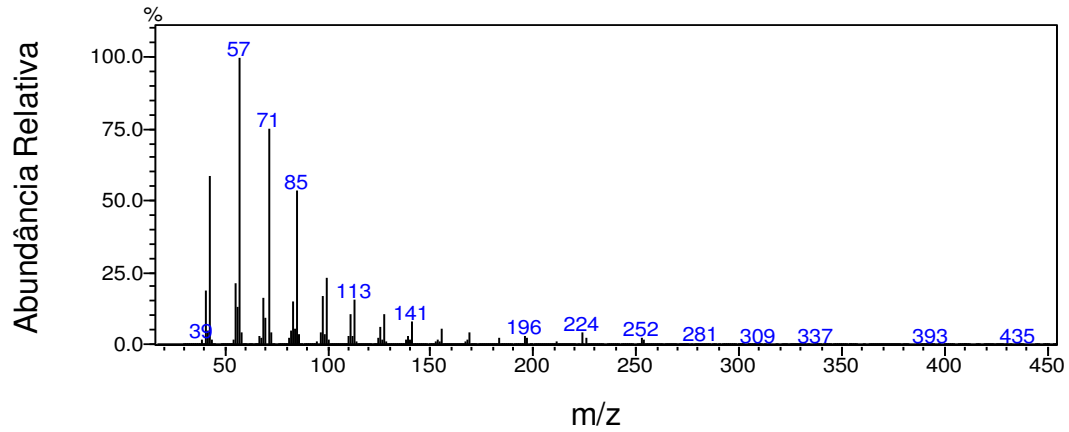


Pico 38

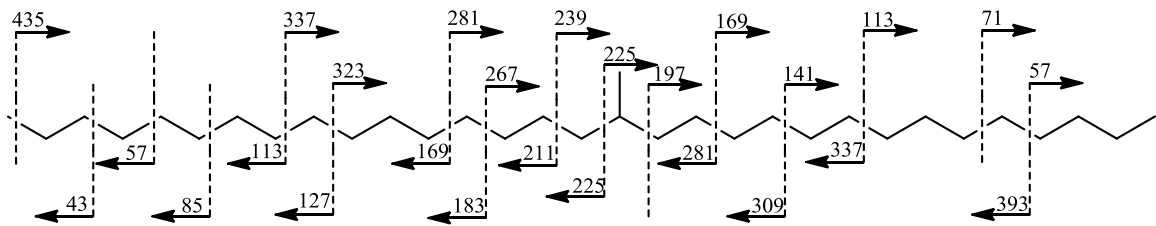
m/z:450

Nome: 15-methylhentriacontane

Espectro:



Fragmentação Manual

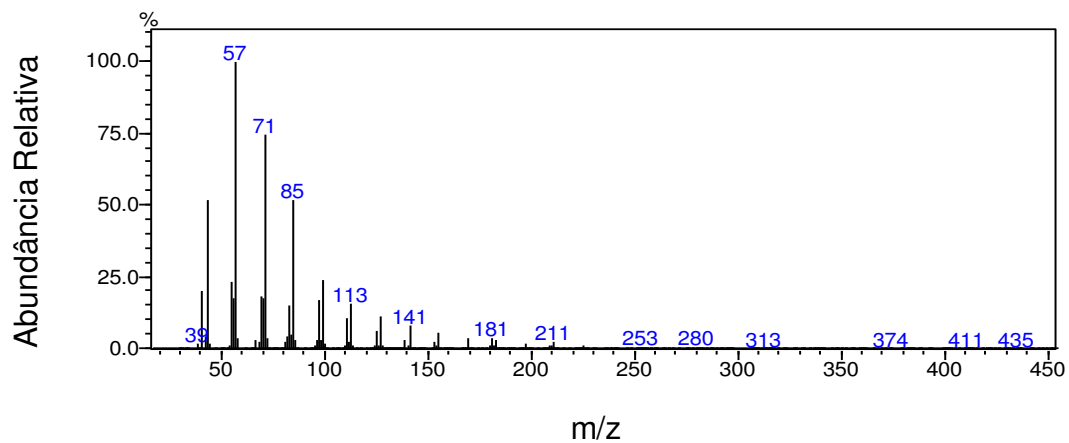


Pico 39

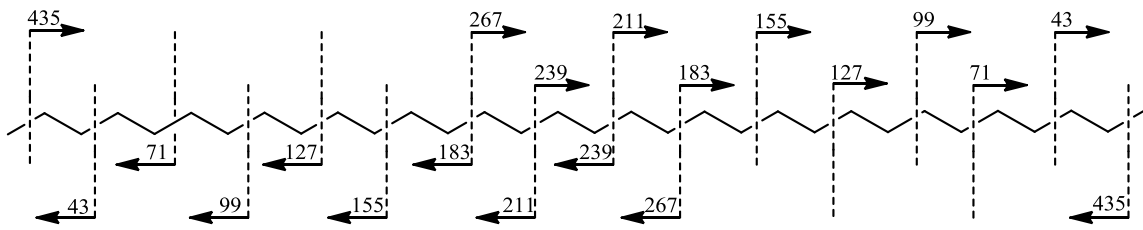
m/z:450

Nome: Dotriacontane

Espectro:



Fragmentação Manual

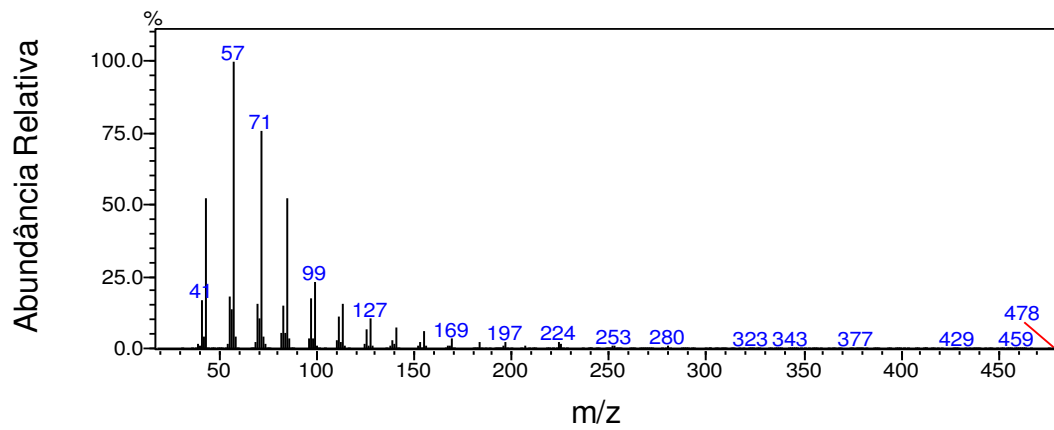


Pico 40

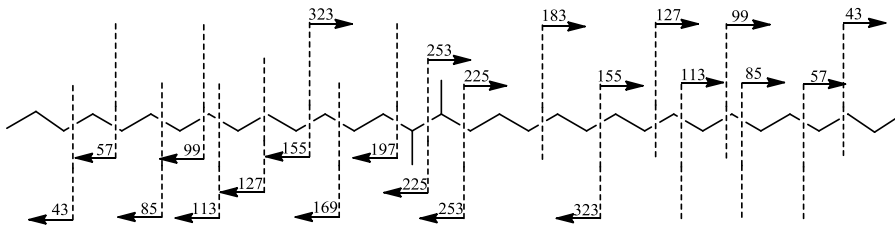
m/z:478

Nome: 15,16-dimethyltriacontane

Espectro:



Fragmentação Manual



Franciele Grego Esteves

-Aluna -

Prof. Dr. Mario Sergio Palma

- Orientador -