



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Unidade Universitária de Dourados
Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

**ASSINATURA QUÍMICA CUTICULAR DE *Polistes versicolor*
AO LONGO DOS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO E
EM AGREGADOS**

Jane Herondi dos Santos Brito

DOURADOS-MS

Dezembro/2013





Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Dourados

Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

**ASSINATURA QUÍMICA CUTICULAR DE *Polistes versicolor*
AO LONGO DOS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO E
EM AGREGADOS**

Jane Herondi dos Santos Brito (Acadêmica)

Prof. Dra. Claudia Andrea Lima Cardoso (Orientadora)

Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior (Coorientador)

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, área de concentração em Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais”.

DOURADOS-MS

Dezembro/2013

FICHA CATOLOGRÁFICA

Brito, Jane Herondi dos Santos

Assinatura química cuticular de *Polistes versicolor* ao longo dos estágios de desenvolvimento e em agregados/ Jane Herondi dos Santos Brito. Dourados, MS:UEMS, 2013.

63p., 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Recursos Naturais - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2013.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Andréa Lima Cardoso.

Coorientador: Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior.

1. Cromatografia gasosa. 2. Insetos sociais. 3. Assinatura química. I. Título.

CDD

JANE HERONDI DOS SANTOS BRITO

**ASSINATURA QUÍMICA CUTICULAR DE *Polistes versicolor*
AO LONGO DOS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO E
EM AGREGADOS**

Dourados, 18 de dezembro de 2013.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Claudia Andrea Lima Cardoso

Presidente

Dr. Thiago dos Santos Montagna

Prof. Dr. Valter Vieira Alves Junior

“Uma boa cabeça e um bom coração formam uma combinação formidável. Mas quando você adiciona a isso uma língua ou uma caneta alfabetizada, aí você tem algo realmente muito especial”.

Nelson Mandela

(1918-2013)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha filha Gisla Eduarda dos Santos Brito, pelo apoio, carinho, pela compreensão de minhas ausências e pelos sacrifícios realizados.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, por ter me concedido capacidade, força, determinação para realizar este trabalho;

Aos meus familiares, por sempre acreditarem em meu potencial e estarem ao meu lado;

A minha orientadora, Dr^a. Claudia Andrea Lima Cardoso, pelo apoio e amizade dispensados a mim nas horas difíceis quando pensava que não conseguiria durante todos os anos da minha graduação. Em especial nos anos de mestrado, pelo voto de confiança, por acreditar na minha capacidade e por todas outras ocasiões nas quais foram indispensáveis sua ajuda.

Ao Dr. William Fernando Antonialli Junior, meu coorientador, por toda a confiança e suporte, pois sem sua enorme capacidade de trabalho o desenvolvimento desta dissertação não seria possível.

Ao Dr. Thiago dos Santos Montagna, que tanto colaborou comigo, nas coletas, nas análises biológicas, além de inestimável ajuda em todas as demais etapas deste estudo.

Ao Técnico de Nível Superior Msc. Franksteffen Silva Maia, pelo apoio, pela ajuda constante nas análises laboratoriais e em assuntos tecnológicos.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, em especial ao Prof. Dr. Yzel, pelos auxílios estatísticos e ao Prof. Dr. Sandro Marcio Lima pelo apoio.

Aos colegas de mestrado pelo apoio, ajuda e companheirismo, em especial as colegas Cristiane Ávila Santana e Rafaella Caroline Bernardi.

A Denise Sguarizi Antonio, Viviana de Oliveira Torres e a Angélica Mendonça pela ajuda nas análises biológicas e apoio.

A Vanessa Dias Perônico, minha colega de trabalho, pela compreensão, por todo apoio, companheirismo, amizade, disposição e ajuda.

Aos meus amigos, por estarem sempre comigo, presentes em minha vida, me apoiando, incentivando e me ajudando a superar essa etapa em minha vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, pela oportunidade e apoio.

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul pela oportunidade de realizar este trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
1.1 ASPECTOS BIONÔMICOS DE VESPAS SOCIAIS	3
1.2 HÁBITOS DE NIDIFICAÇÃO EM VESPAS SOCIAIS	4
1.3 COMUNICAÇÃO QUÍMICA E FEROMÔNIOS SUPERFICIAIS	6
1.4 OBJETIVOS	9
1.4.1 OBJETIVO GERAL	9
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
1.4.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
CAPÍTULO 1 - EVOLUÇÃO DA ASSINATURA QUÍMICA CUTICULAR AO LONGO DOS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DA VESPA <i>Polistes versicolor</i>	18
RESUMO	18
INTRODUÇÃO	19
MATERIAIS E MÉTODOS	22
COLETA DE MATERIAL	22
ANÁLISE QUÍMICA	23
ANÁLISE ESTATÍSTICA	25

RESULTADOS	26
DISCUSSÃO	32
CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO 2 - ANÁLISE CUTICULAR DE AGREGADOS DE VESPAS	44
<i>Polistes versicolor</i> EMPREGANDO CG-DIC E FTIR-PAS	
RESUMO	44
INTRODUÇÃO	45
MATERIAIS E MÉTODOS	46
COLETA DE MATERIAL	46
ANÁLISE QUÍMICA	48
ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

RESUMO

As vespas sociais como outros insetos sociais, em geral, se comunicam por substâncias químicas conhecidas como feromônios, que atuam de forma decisiva no reconhecimento de companheiras de ninho ou mesmo entre indivíduos que executam diferentes funções na colônia. Neste sentido, cada indivíduo da colônia possui uma assinatura química própria, que é adquirida ao longo do seu desenvolvimento, ou seja, desde o estágio de ovo até a fase adulta. Além disso, essa assinatura química é importante durante as relações entre indivíduos adultos de algumas espécies que ocorrem nos trópicos e que se organizam em agregados, durante uma época em que o ambiente está menos propício a fundação e manutenção de uma colônia. Dessa forma, um dos objetivos deste estudo foi investigar a evolução da composição química cuticular ao longo de todos os estágios de desenvolvimento de *Polistes versicolor*. De forma complementar também foram avaliadas as diferenças da química cuticular encontradas entre fêmeas de agregados desta espécie, com diferentes condições fisiológicas do ovário. As análises demonstram que há uma variação da química cuticular, desde ovos até o adulto. Esta variação é, de forma geral quantitativa, embora alguns compostos possam definir melhor o estágio de ovo em relação aos demais. Contudo, esta variação entre os estágios foi a mesma entre as diferentes colônias, provavelmente efeito de um grau de parentesco próximo, ou por compartilharem o mesmo ambiente. No estudo com agregados houve uma distinção na composição química cuticular entre fêmeas com diferentes graus de desenvolvimento ovariano, bem como a definição que fêmeas oriundas de agregados distintos se diferenciam pela química de sua cutícula. Também é possível diferenciar fêmeas fecundadas de não fecundadas, nestes agregados.

Palavras-chave: cromatografia gasosa, insetos sociais, assinatura química.

ABSTRACT

The social wasps and other social insects generally communicate by chemical substances that are known as pheromones, which act decisively in recognition of partners or even among individuals who perform different functions in the colony. In this sense, each individual in the colony has its own chemical signature that is acquired during its development, i.e., from the egg stage to adulthood. Moreover, this chemical signature is important for relations between adults of some tropical species that are organized in clusters, during a time when the environment is less conducive to the rise and maintenance of a colony. Thus, the aim of this study was to investigate the evolution of cuticular chemical composition throughout all stages of development of *Polistes versicolor*. Complementarily, the differences of cuticular chemical found in females of aggregates of this species with different physiological conditions of the ovary were also evaluated. The analyzes show that there is a clear variation in the cuticular chemistry, from the egg to adulthood stage. This variation is in general quantitative, although some compounds may better define a stage from another. However, this variation between stages was the same among different colonies, probably due to some degree of kinship or to sharing the same environment. In the study of aggregates there was a distinction in the cuticular chemical composition between females with different degrees of ovarian development, as well as the definition that females whose distinct clusters differ in the chemistry of their cuticle. One can also distinguish fertilized from unfertilized females in these households.

Key words: gas chromatography, social insects, chemical signature.

INTRODUÇÃO GERAL

Aspectos bionômicos de vespas sociais

Os insetos pertencem ao maior e mais diversificado grupo de animais existentes na terra, e podem ser encontrados em diversos habitats (Grimaldi & Engel, 2005). Dentro da classe Insecta, a ordem Hymenoptera, que incluem as vespas, abelhas e formigas, se destaca pela organização de seus indivíduos (Wilson, 1971; Buzzi, 2010; Gullan & Cranston, 2010). Dentre os que se organizam em sociedade existem aqueles reconhecidos como eussociais, que incluem todas as formigas (Gullan & Cranston, 2010) e várias espécies de abelhas e vespas (Ross & Matthews, 1991; Gullan & Cranston, 2010).

As vespas sociais compreendem cerca de 4600 espécies descritas divididas em seis subfamílias monofiléticas atuais (Carpenter & Rasnitsyn, 1990). Especialmente em Polistinae, algumas das espécies são eussociais com traços ancestrais (Carpenter, 1993). A distribuição de Polistinae é cosmopolita, sendo sua maior diversidade encontrada na região tropical, sobretudo, na região Neotropical (Carpenter & Marques, 2001). Richards (1971) sugeriu que diversos gêneros de Polistinae diversificaram-se nos trópicos asiáticos, e sua distribuição em um ambiente não tropical, foi conseguida ao longo de sua evolução.

No Brasil há registro de 22 gêneros de Polistinae, distribuídos desde a Floresta Amazônica até o Pantanal e Mata Atlântica (Carpenter & Marques, 2001). Dentro da classificação mais atual, essa subfamília é dividida em quatro tribos: Epiponini, Mischocyttarini, Ropalidiini e Polistini. As espécies dessas quatro tribos apresentam comportamento eussocial, mas diferem entre si quanto aos detalhes da vida social (Ross & Matthews, 1991).

As vespas Polistinae apresentam, em geral, dois padrões de fundações de colônias, fundação independente e fundação por enxameagem (Jeanne, 1991). Em grupos com fundação independente, uma ou mais rainhas não acompanhadas por operárias, iniciam uma nova colônia, que pode ocorrer por ambas às formas, haplométrica ou pleométrica (Rodrigues, 1968; Jeanne, 1991; Nagamati Junior et al., 2010). Em fundações independentes a dominância reprodutiva é exercida principalmente por comportamentos agressivos da rainha, já que nesses grupos há pouca ou nenhuma diferenciação morfológica entre as castas (Ross & Matthews, 1991).

Colônias de fundação independente, em geral apresentam poucos indivíduos, e os ninhos não possuem um envelope de cobertura. Esse padrão de fundação de colônias pode ser encontrado em quatro gêneros, *Polistes*, *Mischocyttarus*, *Belonogaster* e *Parapolybia* e em algumas espécies de *Ropalidia* (Gadagkar, 1991). Em haplometrose uma única fêmea fecundada dá início a uma nova colônia e realiza todas as tarefas relacionadas à construção, manutenção e defesa do ninho até que as primeiras operárias emergem (Rodrigues, 1968; Jeanne, 1991). Em pleometrose várias fêmeas participam na fase de fundação do ninho, que depois de estabelecido, uma única fêmea torna-se a dominante e realiza todo o trabalho reprodutivo (Rodrigues, 1968; Jeanne, 1991).

Hábitos de nidificação em vespas sociais

A construção de ninhos expostos é uma das principais características da vida social na maioria das vespas Polistinae (Starr, 1991). Para a construção do ninho essas vespas em grande parte utilizam um produto tipo-papel, constituído basicamente pela mistura de fibra vegetal triturada e secreção salivar, que pode variar consideravelmente em espessura e textura entre os diversos grupos de vespas (Richards & Richards, 1951). Entre as vespas sociais Polistinae, o

arranjo arquitetônico dos ninhos em vários aspectos, tem sido relativamente variável (Wenzel, 1991).

Essas variações, principalmente no que se refere à presença ou não do envelope de cobertura em favos com ou sem pedicelo, constituem considerável valor taxonômico, e substancialmente tem ajudado na classificação das espécies de vários grupos (Richards, 1978; Wenzel, 1991). Por exemplo, para grupos mais derivados dentro de Polistinae, como o gênero *Polybia*, o ninho é formado por vários favos envelopados, sendo o primeiro fixo diretamente ao substrato sem a presença de pedicelo, e para grupos menos derivados como o gênero *Polistes*, o ninho é formado por um único favo descoberto, o qual é fixo ao substrato por um único pedicelo (Jeanne, 1975; Wenzel, 1998). Com poucas exceções os ninhos que não tem seus favos protegidos com envelope são suspensos por um pedicelo e aqueles que têm seus favos presos diretamente ao substrato são protegidos por um envelope (Jeanne, 1975).

Uma das funções fundamentais do ninho em insetos sociais é promover o controle homeostático, tido como de fundamental importância para o desenvolvimento colonial (Jones & Oldroyd, 2007).

Em ninhos de vespas sociais o controle das variáveis físicas ambientais é feito na forma de células individuais (Jeanne, 1975). Hozumi et al. (2005) mostraram que a temperatura interna dos ninhos em três espécies de *Polybia* sofre menos variação extrema que a temperatura externa e que essa sofre ainda pequenas variações mesmo dentro do ninho. Dados similares foram obtidos por Jeanne & Morgan (1992) estudando ninhos de vespas do gênero *Polistes*. Esses autores sugerem existir um grande esforço entre os membros da colônia para manter uma condição física ideal que permita o desenvolvimento dos indivíduos.

Diante dessa necessidade de controle homeostático os ninhos de vespas são construídos preferencialmente em locais que promovem menor variação ambiental. Este fato pode explicar

em parte o alto índice de nidificações em ambientes antrópicos, já que nesses locais as vespas encontram em geral as condições físicas necessárias para o desenvolvimento da colônia. Entretanto, não é incomum encontrar populações de vespas sociais ocorrendo em ambientes naturais (Hunt et al., 1995).

Comunicação química e feromônios superficiais

Como todo animal que vive em grupo, os insetos sociais, desenvolveram sistemas de comunicação por meio de sinais sonoros, táteis, visuais e químicos, sendo que neste último, utilizam substâncias químicas que lhes permitem detectar a presença de presas, inimigos, parceiros sexuais e até diferenças de status sociais de indivíduos da própria colônia (Vilela & Della Lúcia, 1987; Krasnec & Breed, 2013). As substâncias químicas utilizadas pelos insetos são denominadas de semioquímicos (sinais químicos), que se dividem em aleloquímicos que são responsáveis pelas interações interespecíficas e feromônios que são responsáveis pelas interações intraespecíficas (Ferreira & Zarbin, 1998; Zarbin & Rodrigues, 2009).

Os feromônios são substâncias que quando secretadas por um indivíduo, provocam no receptor uma reação específica (Gullan & Cranston, 2010). É devido a ação dos feromônios que os indivíduos de uma colônia apresentam comportamento de agregação, alarme, demarcação de espaço, oviposição, entre outros aspectos comportamentais e fisiológicos (Vilela & Della Lúcia, 1987; Millor et al., 2006; Zarbin & Rodrigues, 2009; Pollard, 2010).

Dentre os diversos tipos de feromônios usados na comunicação por insetos (Zarbin & Rodrigues, 2009), existem aqueles que são chamados de superficiais. Estes feromônios são encontrados na camada superficial da cutícula do inseto, e são compostos por vários tipos de substâncias (Gullan & Cranston, 2010). Essas substâncias são primordiais na proteção a desidratação (Said et al., 2005; Blomquist & Bagnères, 2010; Ferreira-Caliman et al., 2013),

principalmente os hidrocarbonetos que estão presentes na cutícula externa (Gullan & Cranston, 2010).

Os hidrocarbonetos cuticulares, por outro lado, atuam nos processos de sinalização química tanto dentro, como entre colônias (Lockey, 1988; Blomquist & Bagnères, 2010), além da diferenciação de companheiros e não companheiros de ninho (Gamboa, 2004; Lucas et al., 2005; Cotoneschi et al., 2007; Ferreira-Caliman et al., 2010; Kroiss et al., 2011; Bos et al., 2012; Costanzi et al., 2013), funcionando, portanto, como uma assinatura química.

Portanto, os hidrocarbonetos estão diretamente ligados tanto à identificação dos papéis dos indivíduos dentro da colônia bem como da definição da assinatura química da própria colônia (Krasnec & Breed, 2013). Ainda segundo Krasnec & Breed (2013) as análises dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares têm fornecido dados que atestam que cada colônia possui perfil cuticular específico. Por outro lado, vários estudos apontam diferenças nos hidrocarbonetos cuticulares, até mesmo entre as castas (Dapporto et al., 2005; Antonialli-Junior et al., 2007; Antonialli-Junior et al., 2008; Lorenzi et al., 2011; Ferreira et al., 2012; Neves et al., 2012).

Ainda, alguns estudos descrevem que, com base na composição de hidrocarbonetos cuticulares consegue-se também diferenciar larvas, pupas e adultos, como foi descrito por Cotoneschi et al. (2007) avaliando as diferenças na composição química entre larvas e adultos de *Polistes dominulus* e por Brow et al. (1991) que também identificaram diferenças quantitativas nas composições de hidrocarbonetos cuticulares de larvas, pré-pupas, pupas e adultos de *Vespula germânica*.

Golebiowski et al. (2012) avaliaram diferenças quantitativas entre as substâncias cuticulares de diferentes estágios da espécie de mosca *Lucilia sericata*. Yoon et al. (2012), além disto, avaliaram que a assinatura química completa de um inseto é adquirida ao longo de todos os estágios de seu desenvolvimento.

Para analisar as substâncias cuticulares em insetos, a cromatografia gasosa é uma técnica comumente empregada (Gamboa et al., 1996; Lorenzi et al., 2004; Kroiss et al., 2011; Costanzi et al., 2013). A cromatografia gasosa apresenta muitas vantagens como técnica de análise, tais como: grande resolução e alta sensibilidade, podendo ser usada em substâncias voláteis ou facilmente volatilizáveis e que sejam estáveis termicamente, efetuando a separação e identificação de diversos componentes nas amostras em função dos detectores empregados nas análises e também permite a quantificação dos constituintes em nível de traços nas amostras (Collins et al., 2006).

Especificamente em vespas, vários autores empregam a cromatografia gasosa como instrumento de análise, como Bonckaert et al. (2012) que analisaram a composição cuticular do ovo de *Vespula vulgaris*, Dapporto et al. (2004) avaliaram a variação da composição química cuticular de diferentes populações de *P. dominulus* e outros trabalhos utilizaram esta técnica para avaliar as diferenças nos compostos cuticulares entre castas (Dapporto et al., 2005; Dapporto et al., 2007; Dapporto et al., 2008). Mais especificamente, Cotoneschi et al. (2007) investigando *P. dominulus* analisaram o perfil cuticular de larvas e adultos, Dapporto et al. (2006) avaliaram a relação de dominância em *Ropalidia opifex*, Costanzi et al. (2013) em experimento com usurpação em colônias de *P. dominulus* por *Polistes nimphus*, além de Ferreira et al. (2012) em estudo sobre perfis de hidrocarbonetos cuticulares de três espécies de vespas do gênero *Mischocyttarus*.

Mais recentemente outra técnica, a espectroscopia óptica de absorção fotoacústica por transformada de Fourier, vem sendo utilizada para avaliar a química cuticular em himenópteros sociais (Antoniali-Junior et al., 2007; Antoniali-Junior et al., 2008; Neves et al., 2012; Neves et al., 2013). Esta técnica não permite identificar as substâncias presentes na amostra, e sim os picos que podem ser atribuídos a vários grupos funcionais presentes nas mesmas, como

hidrocarbonetos cuticulares Esta técnica apresenta como principais vantagens não ser necessário qualquer preparo prévio da amostra, tempo reduzido de análise e não ser destrutiva (Greene et al. 1992). Sendo considerada de fácil manuseio, além de apresentar alta sensibilidade e boa resolução (Skoog et al. 2002).

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a evolução da assinatura química desde o estágio de ovo até o adulto e as diferenças da química cuticular entre fêmeas de agregados de *P. versicolor*.

Objetivos específicos

- Investigar as mudanças que ocorrem na composição da química cuticular, ao longo do desenvolvimento da vespa *P. versicolor* empregando cromatografia gasosa.
- Avaliar as diferenças químicas entre fêmeas de agregados com diferentes condições de fisiologia reprodutiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIALLI-JUNIOR, W. F.; LIMA, S. M.; ANDRADE L. H. C.; SUAREZ, Y. R. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier Transform-Infrared Photoacoustic Spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 492- 499, 2007.
- ANTONIALLI-JUNIOR, W.F.; SUÁREZ, Y.R.; IZIDA, T.; ANDRADE, L.H.C.; LIMA, S.M. Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 559-566, 2008.
- BLOMQUIST, G. J.; BAGNÈRES, A-G. **Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology**, Cambridge University Press, 2010. 506 p.
- BONCKAERT, W.; DRIJFHOUT, F. P.; D'ETTORRE, P.; BILLEN, J.; WENSELEERS, T. Hydrocarbon signatures of egg maternity, caste membership and reproductive status in the common wasp. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, p.42–51, 2012.
- BOS, N.; DREIER, S.; JØRGENSEN, C. G.; NIELSEN, J.; FERNANDO J. GUERRIERI, F. J.; D'ETTORRE, P. Learning and perceptual similarity among cuticular hydrocarbons in ants. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p.138–146, 2012.
- BROWN, W. V.; SPRADBERRY, J. P.; LACEY, M. J. Changes in the cuticular hydrocarbon composition during development of the social wasp, *Vespula germanica* (F.) (Hymenoptera: Vespidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 99B, n. 3, p. 553-562, 1991.
- BUZZI, Z. J. **Entomologia Didática**. Curitiba: UFPR, 2010. 389 p.

- CARPENTER, J. M. & MARQUES O. M. **Contribuição ao estudo dos vespídeos do Brasil (Insecta, Hymenoptera, Vespoidae, Vespidae)**. Cruz das Almas, Publicações Digitais, v. 2, 2001. 147 p.
- CARPENTER, J. M. & RASNITSYN, A. P. Mesozoic Vespidae. **Psyche**, v. 97, p. 1-20, 1990.
- CARPENTER, J. M. Biogeographic patterns in the Vespidae (Hymenoptera): Two views of Africa and South America. In: GOLDBLATT, P. (Ed.). **Biological relationships between Africa and South America**. New Haven, CT: Yale University Press, 1993, p. 139-155.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, São Paulo: UNICAMP, 2006. 453 p.
- COSTANZI, E.; BAGNÈRES, A. G.; LORENZI, M. C. Changes in the hydrocarbon proportions of colony odor and their consequences on nestmate recognition in social wasps. **Plos One**, v. 8, n. 5, p. 1-11, 2013.
- COTONESCHI, C.; DANI, F. R.; CERVO, R.; SLEDGE, M. F.; TURILLAZZI, S. *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) larvae possess their own chemical signatures. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p. 954–963, 2007.
- DAPPORTO, L.; THEODORA, P.; SPACCHINI, C.; PIERACCINI, G.; TURILLAZZI, S. Rank and epicuticular hydrocarbons in different populations of the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera, Vespidae). **Insectes Sociaux**, v. 51, p. 279–286, 2004.
- DAPPORTO, L.; SLEDGE, F. M.; TURILLAZZI, S. Dynamics of cuticular chemical profiles of *Polistes dominulus* workers in orphaned nests (Hymenoptera, Vespidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 51, p. 969–973, 2005.
- DAPPORTO, L.; FONDELLI, L.; TURILLAZZI, S. Nestmate recognition and identification of cuticular hydrocarbons composition in the swarm founding paper wasp *Ropalidia opifex*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 617-625, 2006.

- DAPPORTO, L.; DANI, F. R.; TURILLAZZI, S. Social dominance molds cuticular and egg chemical blends in a paper wasp. **Current Biology**, v.17, n.13, 2007. R504.
- DAPPORTO, L.; LAMBARDI, D.; TURILLAZZI, S. Not only cuticular lipids: First evidence of differences between foundresses and their daughters in polar substances in the paper wasp *Polistes dominulus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p.89–95, 2008.
- FERREIRA, A.C.; CARDOSO, C.A.L.; NEVES, E.F.; SÚAREZ, Y.R.; ANTONIALLI-JUNIOR, W.F. Distinct linear hydrocarbon profiles and chemical strategy of facultative parasitism among *Mischocyttarus* wasps. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.4, p. 4351-4359, 2012.
- FERREIRA, J. T.B. & ZARBIN, P. H.G. Amor ao primeiro odor: A comunicação química entre os insetos. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 3-6, 1998.
- FERREIRA-CALIMAN, M. J.; FALCÓN, T.; MATEUS, S.; ZUCCHI, R.; NASCIMENTO, F. S. Chemical identity of recently emerged workers, males, and queens in the stingless bee *Melipona marginata*. **Apidologie**, v. 44, p. 657-665, 2013.
- FERREIRA-CALIMAN, M. J.; NASCIMENTO, F.S.; TURATTI, I.C.; MATEUS, S.; LOPES, N.P.; ZUCCHI, R. The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. **Journal of Insect Physiology**, v.56, p. 800–804, 2010.
- GADAGKAR, R. *Belonogaster*, *Mischocyttarus*, *Parapolybia*, and independent founding *Ropalidia*. In: ROSS, K.G. & MATTHEWS, R.W. (Ed.). **The social biology of wasps**. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1991, p. 149–190.
- GAMBOA, G. J. Kin recognition in eusocial wasps. **Annales Zoologici Fennici**. v. 41, p. 789–808, 2004.

- GAMBOA, G. J.; GRUDZIEN, T. A.; ESPELIE, K. E.; BURA, E. A. Kin recognition pheromones in social wasps: combining chemical and behavioural evidence. **Animal Behaviour**, v. 51, n.3, p.625–629, 1996.
- GOŁEBIOWSKI, M.; PASZKIEWICZ, M.; GRUBBA, A.; GASIEWSKA, D.; BOGUS, M. I.; WŁÓKA, E.; WIELOCH, W.; STEPNOWSKI, P. Cuticular and internal n-alkane composition of *Lucilia sericata* larvae, pupae, male and female imagines: application of HPLC-LLSD and GC/MS-SIM. **Bulletin of Entomological Research**, v.102, p. 453–460, 2012.
- GREENE, R.V.; GORDON, S.H.; JACKSON, M.A.; BENNETT, G.A. Detection of fungal contamination in corn: potential of PAS-FTIR and DRS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1144-1149, 1992.
- GRIMALDI, D. & ENGEL, M. S. **Evolution of the Insects**. New York: Cambridge, 2005. 770 p.
- GULLAN, P. J. & CRANSTON, P. S. **The Insects: an outline of entomology**. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell, 2010. 565p.
- HOZUMI, S., YAMANE, S., MIYANO, S., MATEUS, S. & ZUCCHI, R. Diel changes of temperature in the nests of two *Polybia* species, *P. paulista* and *P. occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae) in the subtropical climate. **Journal of Ethology**, v. 23, p. 153-159, 2005.
- HUNT, J. H.; JEANNE, R. L.; KEEPING, M. G. Observations on *Apoica pallens*, a nocturnal Neotropical social wasp (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae, Epiponini). **Insectes Sociaux**, v.42, p. 223-236, 1995.

- JEANNE, R. L. The swarm-founding Polistinae. In: ROSS, K. G. & MATTHEWS, R. W. (Ed.). **The social biology of wasps**. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1991, p. 191–231.
- JEANNE, R. L. The adaptiveness of social wasp nest architecture. **The quarterly Review of Biology**, v. 50, p. 267-287, 1975.
- JEANNE, R. L. & MORGAN, R. C. The influence of temperature on nest site choice and reproductive strategy in a temperate zone *Polistes* wasp. **Ecological Entomology**, v.17, p. 135-141, 1992.
- JONES, J. C. & OLDROYD, B. P. Nest thermoregulation in social insects. **Advances in Insect Physiology**, v.33, p. 153-191, 2007.
- KRASNEC, M.O. & BREED, M. D. Colony-Specific Cuticular hydrocarbon profile in *Formica argentea* Ants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p.59–66, 2013.
- KROISS, J.; SVATOŠ, A.; KALTENPOTH, M. Rapid identification of insect cuticular hydrocarbons using Gas Chromatography—Ion-Trap Mass Spectrometry. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, p. 420–427, 2011.
- LOCKEY, K. H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 89B, p. 595-645, 1988.
- LORENZI, M. C.; SLEDGE, M. F.; LAIOLO, P.; STURLINI, E.; TURILLAZZI, S. Cuticular hydrocarbon dynamics in young adult *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) and the role of linear hydrocarbons in nestmate recognition systems. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 935–941, 2004.
- LORENZI, M. C.; CERVO, R.; BAGNÈRES, A. G. Facultative social parasites mark host nests with branched hydrocarbons. **Animal Behaviour**, v. 82, p.1143-1149, 2011.

- LUCAS, C.; PHO, D. B.; JALLON, J. M.; FRESNEAU, D. Role of cuticular hydrocarbons in the chemical recognition between ant species in the *Pachycondyla villosa* species complex. **Journal of Insect Physiology**, v. 51, p. 1148–1157, 2005.
- MILLOR, J.; AME´, J. M.; HALLOY, J.; DENEUBOURG, J.L. Individual discrimination capability and collective decision-making. **Journal of Theoretical Biology**, v. 239, p. 313–323, 2006.
- NAGAMATI JUNIOR, K.; SIMOKOMAKI, K.; GRUBER, C. V.; DEL LAMA, M. A. Sociogenetic structure of *Polistes* (Aphanilopterus) *versicolor* Olivier, 1791 colonies (Hymenoptera, Vespidae, Polistini). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n.4, p.669-675, 2010.
- NEVES, E. F.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R.; LIMA, S. M.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F. Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 1891-1898 2012.
- NEVES, E. F.; MONTAGNA, T. S.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R.; LIMA, S. M.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F. Social parasitism and dynamics of cuticular hydrocarbons in paper wasps of the genus *Mischocyttarus*. **Journal of the Kansas Entomological Society**. v.86, n.1, p. 69-77, 2013.
- POLLARD, K. A. Making the most of alarm signals: the adaptive value of individual discrimination in an alarm contexto. **Behavioral Ecology**, v. 1, p. 93-100, 2010.
- RICHARDS O.W. **The social wasps o the Americas excluding the Vespinae**. London, British Museon (Natural History), 1978, 580 p.
- RICHARDS, O. W. The biology of the social wasps (Hymenoptera, Vespidae). **Biological Reviews**, v. 46, p. 483-528, 1971.

- RICHARDS, O. W. & RICHARDS, M. J. Observations on the social wasps of South America (Hymenoptera, Vespidae). **Transactions of the Royal Entomological Society**, v.102, p. 1-170, 1951.
- RODRIGUES, V. M. **Estudo sobre vespas sociais do Brasil (Hymenoptera, Vespidae)**. 1968. Tese (Doutorado em Zoologia), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, Rio Claro, 1968.
- ROSS, K. G. & MATTHEWS, R. W. (Ed.) **The social biology of wasps**. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1991. 678 p.
- SAID, I.; COSTAGLIOLA, G.; LEONCINI, I.; RIVAULT, C. Cuticular hydrocarbon profiles and aggregation in four *Periplaneta* species (Insecta: Dictyoptera). **Journal of Insect Physiology**, v. 51, p. 995–1003, 2005.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5^a edição. Porto Alegre: Bookman. 2002. 868 p.
- STARR, C. K. The nest as the locus of social life. In: ROSS, K.G. & MATTHEWS, R.W. (Ed.). **The social biology of wasps**. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1991. p. 520-539.
- VILELA, E. F. & DELLA LÚCIA, T. M. C. **Feromônios de insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1987. 155 p.
- YOON, C.; YANG, J. O.; YOUN, Y. N.; KIM, G. H. Changes in cuticular hydrocarbons in different developmental stages of the bean bug, *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 15, p.579–587, 2012.
- ZARBIN, P. H. G. & RODRIGUES, M. A. C. M. Feromônios de insetos: Tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.722-731, 2009.

- WENZEL J. W. Evolution of nest architecture. In: ROSS, K.G. & MATTHEWS, R.W. (Ed.).
The social biology of wasps. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1991. p. 480-519.
- WENZEL J. W. A generic key to the nests of hornets, yellowjackets, and paper wasps worldwide (Vespidae: Vespinae, Polistinae). **American Museum Novitates**, v. 3224, 1998. 39 p.
- WILSON, E. O. **The insect societies.** Cambridge, Belknap Press, 1971. 548p.

CAPÍTULO 1 – EVOLUÇÃO DA ASSINATURA QUÍMICA CUTICULAR AO LONGO DOS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DA VESPA *Polistes versicolor*

Resumo

As vespas sociais pertencem a uma sociedade que é altamente complexa e diversificada, destacando-se pela organização social e cuidado com a prole. Estas usam as substâncias químicas em sua comunicação diária que atuam de forma incisiva no reconhecimento de companheiras e não companheiras de ninho ou mesmo entre indivíduos de diferentes castas. Dessa forma foi realizado um estudo da composição cuticular ao longo do desenvolvimento da vespa *Polistes versicolor*, desde o estágio de ovo até a fase adulta, com o objetivo de avaliar as mudanças que ocorrem na assinatura química da espécie, empregando a cromatografia gasosa com detector de ionização em chama e cromatografia gasosa com detector de massas. Na análise cuticular foram identificados alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos que foram importantes para distinguir os vários estágios de desenvolvimento de *P. versicolor*. A partir de análises estatísticas com estes compostos foi determinado que o estágio de ovo, já possui características de sua colônia. O estágio de ovo, estágios larvais, pré-pupas e pupas apresentam diferenciação entre si e também em relação à fase adulta da espécie.

Palavras-chave: insetos sociais, ínstares larvais, feromônios superficiais.

Introdução

Vespas Polistes versicolor são neotropicais e podem ser encontradas desde a Costa Rica até a Argentina (Richards, 1978). São caracterizadas principalmente por sua eussocialidade, apresentando ninhos com único favo (Rodrigues, 1968), podendo haver colônias fundadas por uma única fêmea fertilizada ou com duas ou mais fêmeas fertilizadas e poedeiras (Rodrigues, 1968; Nagamati Junior et al., 2010). Seu desenvolvimento é do tipo holometábolo, com larvas de cinco diferentes ínstares (Rodrigues, 1968; Prezoto & Gobbi, 2005).

Assim como outras vespas sociais, apresentam divisão de trabalho, cooperação entre os seus membros no cuidado com a prole, além de uma sobreposição de geração, características que contribuem para manutenção da coesão de suas colônias (Wilson, 1971; Gullan & Cranston, 2010).

O principal fator que influencia a coesão dentro de uma colônia de insetos sociais é a capacidade de comunicação entre eles, que pode ser por meio de sinais visuais, sonoros, táteis e químicos, sendo que estes últimos são os mais efetivos, denominados de semioquímicos e usados para várias funções, como defesa, forrageamento, determinação de tarefas, entre outros (Vilela & Della Lucia, 1987; Lorenzi et al., 2004; Zarbin & Rodrigues, 2009; Ferreira-Caliman et al., 2013).

Esses compostos quando utilizados na comunicação intraespecífica são denominados de feromônios (Zarbin & Rodrigues, 2009), sendo que há um tipo em especial denominado de feromônios superficiais, encontrados na cutícula do inseto e que atuam primariamente na proteção contra a desidratação (Said et al., 2005; Ferreira-Caliman et al., 2013).

Estes feromônios, no entanto, também atuam nos processos de sinalização tanto na colônia como entre colônias (Lockey, 1988; Blomquist & Bagnères, 2010), na distinção de companheiros e não companheiros de ninho (Gamboa, 2004; Lucas et al., 2005; Cotoneschi et al., 2007; Ferreira-Caliman et al., 2010; Kroiss et al., 2011; Bos et al., 2012; Costanzi et al., 2013;).

De fato, interações mediadas por feromônios superficiais ocorrem entre os insetos em geral, e vários estudos vem sendo conduzidos especificamente com vespas do gênero *Polistes* (Dapporto et al., 2004; Dapporto et al., 2005; Cotoneschi et al., 2007; Dapporto et al., 2007; Dapporto et al., 2008; Cotoneschi et al., 2009; Lorenzi et al., 2011).

Durante a comunicação, sobretudo, para distinguir membros de sua colônia e as tarefas por eles executadas, as vespas se utilizam de várias substâncias químicas presentes em sua cutícula (Blomquist & Bagnères, 2010). Essas substâncias são compostas basicamente por hidrocarbonetos, principalmente por alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos (Howard & Baker, 2004; Dapporto et al., 2005; Devigne & Biseau, 2012; Gołębiowski et al., 2013; Olaniran et al., 2013).

Os hidrocarbonetos cuticulares segundo Krasnec & Breed (2013), podem ser específicos para cada colônia, podendo apresentar tanto variações qualitativas quanto quantitativas de uma colônia para outra, e esses compostos podem variar ao longo dos estágios de desenvolvimento.

Neste sentido, alguns trabalhos já demonstraram que a assinatura química cuticular difere entre os vários estágios de desenvolvimento, como no caso do percevejo *Riptortus pedestris* no qual foram analisados a composição cuticular de ovos, larvas e adultos, identificando diferenças qualitativas entre a cutícula de ovos e demais estágios, além de diferenças quantitativas em todos os estágios de desenvolvimento (Yoon et al., 2012). Em estudo com mosca *Lucilia sericata*

foram relatadas diferenças quantitativas entre os compostos cuticulares analisados entre os estágios de desenvolvimento dessa espécie (Golebiowski et al., 2012).

Em vespas sociais, Brow et al. (1991) identificaram diferenças quantitativas na composição de hidrocarbonetos cuticulares de larvas, pré-pupas, pupas e adultos da *Vespula germanica*, tornando possível diferenciar seus estágios de desenvolvimento, além de poder distinguir entre machos, fêmeas e até entre as fases pupais da espécie. Segundo Lorenzi et al. (2004) os hidrocarbonetos cuticulares encontrados em *Polistes dominulus* aumentam de forma quantitativa após a emergência da fase adulta.

Em estudo realizado por Dapporto et al. (2007) com vespas *P. dominulus*, foram analisados os perfis químicos de ovos e da cutícula de fêmeas beta e alfa em colônias experimentais, sendo que o perfil químico de cada tipo de ovo correspondeu ao perfil da respectiva fêmea que o colocou. Da mesma forma Lommelen et al. (2008) avaliando a cutícula de ovos e operárias férteis de formigas *Gnamptogenys striatula* determinaram que ovos possuem composição cuticular similar aos das fêmeas que realizaram a oviposição.

Para análises de compostos cuticulares de insetos são necessários métodos e técnicas com alta precisão. Técnicas de grande resolução são fundamentais para determinar a composição cuticular de insetos, pois podem propiciar uma melhor compreensão do funcionamento da fisiologia e sua interação com outros de sua espécie (Golebiowski et al., 2013).

Um método comumente utilizado para este fim é a cromatografia gasosa (Gamboa et al., 1996; Lorenzi et al., 2004; Kroiss et al., 2011; Ferreira et al., 2012; Costanzi et al., 2013). Esta técnica pode ser usada para compostos voláteis ou facilmente volatilizáveis e que sejam estáveis termicamente, além de seu alto poder de resolução permite a quantificação de substâncias na ordem de picogramas (Collins et al., 2006).

Portanto, uma vez que há poucos trabalhos da literatura que já investigaram a composição química cuticular desde ovo até adulto em vespas eussociais, o objetivo deste trabalho foi avaliar a evolução que ocorre na composição química cuticular, ao longo do desenvolvimento da vespa *Polistes versicolor* empregando cromatografia gasosa.

Materiais e Métodos

Coleta e seleção de material

Foram utilizadas 10 colônias, em fase de operária, de vespas *P. versicolor* coletadas, entre fevereiro e março de 2013 em uma região de mata da Fazenda Coqueiro, localizada no município de Dourados/MS (S 22° 12' 43''; W 54° 54' 53''). Estas colônias foram extraídas de seu sítio de nidificação durante o período noturno, envolvendo-as com um recipiente plástico em torno do ninho e em seguida despregando o pedúnculo do substrato de fixação. Toda a população, em seguida, foi levada ao laboratório e armazenada em geladeira à 4° C por até cinco dias, período em que as amostras dos estágios de desenvolvimento foram pesadas e catalogadas antes do processo de extração e análise química.

Foi analisada a composição química cuticular de todos os estágios de desenvolvimento do inseto: ovos, larvas, pré-pupas, pupas e adultos. Para confirmar os cinco ínstaes larvais da espécie (Rodrigues, 1968), foram empregadas as medidas da largura da cápsula cefálica de 758 larvas, com média de 75 larvas por colônia com auxílio de estereomicroscópio Zeiss Stemi 2000-C, equipado com ocular micrométrica e câmera digital. Os valores obtidos foram comparados com os resultados encontrados por Pinheiro et al. (2011) para esta espécie e as larvas foram classificadas em cinco (I, II, III, IV e V) ínstaes.

No estágio definido como pré-pupa foram utilizadas os indivíduos que já estão envelopados, porém ainda se encontram na forma larval. Camargo (2002) definiu pré-pupas como indivíduos no final da fase larval quando a célula é operculada e a larva fica sem alimentação, ficando reta e imóvel dentro do casulo.

Todos os indivíduos (ovos, larvas, pré-pupas, pupas e adultos) foram sacrificados por congelamento e conservados à - 5° C até a etapa de extração. A extração dos hidrocarbonetos cuticulares ocorreu 5 dias após a coleta do material e foi realizada utilizando o indivíduo inteiro independente do estágio de desenvolvimento.

Para avaliar possíveis variações na composição de alcanos lineares por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC) presentes na cutícula ao longo de todos os estágios de desenvolvimento foram usadas cinco amostras de cada estágio por colônia: ovos, todos os ínstares larvais, pré-pupas, pupas e adultos, totalizando 450 amostras em 10 colônias. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi empregada para avaliar alcanos lineares, alcenos e alcanos ramificados de três amostras, de cada estágio, por colônia, totalizando 270 amostras nas 10 colônias.

Extração

Os constituintes cuticulares, de cada amostra, foram extraídos com 1 mL de hexano (grau HPLC, TEDIA) por 2 minutos, empregando banho em ultrassom e após filtração o solvente foi eliminado em capela de exaustão. Cada extrato foi dissolvido em 50 µL de hexano para as análises cromatográficas.

Análise química

A mistura padrão de C₇-C₃₁ (Sigma Aldrich com pureza $\geq 90\%$), foi preparada na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano (grau HPLC-TEDIA).

As amostras e a mistura padrão de alcanos lineares foram analisados empregando um cromatógrafo à gás com detector de ionização em chama (Thermo Scientific – Focus GC, San Jose, CA, USA), com coluna capilar OV-5 (Ohio Valley Specialty Company, Marietta, OH, USA) 5% fenil dimetilpolisiloxano (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 μm de espessura). Injeção de 1 μL em modo splitless. Temperaturas do injetor e detector a 280 °C, usando N₂ como gás carregador (99,999% e velocidade de fluxo de 1,0 mL min^{-1}). Rampa de aquecimento com temperatura inicial de 50 °C por três minutos alcançando 280°C à 8°C min^{-1} e permanecendo à 280°C por 15 minutos. Os cromatogramas foram registrados pelo programa Chrom Quest 5.0 e analisados pelo programa Workstation Chrom Data Review.

Para identificar a presença de outras substâncias, além dos alcanos lineares nas amostras, foram realizadas análises empregando-se um cromatógrafo gasoso (GC-17A, Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector de massas (QP 5050), usando uma coluna capilar DB-5 (J & W, Folsom, California) 5% de fenil dimetilpolisiloxano (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 μm de espessura). As condições de análise foram: gás carregador de hélio (99,999% e velocidade de fluxo de 1,0 mL min^{-1}); volume de injeção de 1 μL , modo de injeção splitless. Rampa de aquecimento com temperatura inicial de 50 °C por três minutos alcançando 280°C à 3°C min^{-1} e permanecendo na temperatura final por 15 minutos. Temperatura do injetor, detector e da linha de transferência foram 280°C. Os parâmetros de varredura do EM incluíram voltagem de ionização de impacto de elétron de 70 eV, uma faixa de massa de 45 a 600 m/z e um intervalo de varredura de 0,5 s. Em relação aos alcanos ramificados

e alcenos para esta espécie foi realizada a identificação das proporções desses compostos presentes na cutícula sem especificar o composto individualmente.

Tratamento dos dados

Os alcanos lineares analisados por CG-DIC nos estágios de desenvolvimento da vespa *P. versicolor* foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões de C₇-C₃₁.

Para as amostras analisadas por CG-EM, as identificações dos alcanos lineares foram realizadas por comparação dos tempos de retenção dos padrões com os picos presentes nas amostras associadas à análise dos espectros de massas. Os demais componentes foram caracterizados por comparação dos espectros de massas obtidos com a base de dados da NIST 2.0, índice de retenção e dados da literatura (Adams, 2001).

Análises estatísticas

Tanto os dados obtidos por CG-DIC quanto por CG-EM tiveram suas áreas percentuais relativas submetidos primeiramente à análise de variância multivariada (MANOVA) para obtenção dos valores individuais de P e F. Na sequência foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) seguido de uma MANOVA, por meio do Software SYSTAT 12.

Após a análise estatística, os dados selecionados foram Wilk's lambda, F e P. Wilk's lambda que são usados como parâmetros de avaliação da diferença entre os grupos, sendo que valores próximos de 0 (zero) indicam que não há sobreposição dos grupos e valores próximos de 1 (um) indicam alta sobreposição entre os grupos (Vieira et al., 2009). Altos valores de F mostram uma maior significância dos dados e P é significativo para valores menores que 0.05 (Triola, 2008; Goodpaster & Kennedy, 2011). Foi realizado o cálculo do desvio padrão relativo,

sendo que valores menores que 5% indicam que não ocorreram alterações significativas entre as amostras (Shah et al, 1992).

Resultados

Na análise por CG-DIC foram avaliados 25 alcanos lineares com cadeia carbônica variando entre C₇-C₃₁ (Figura 1, Tabela 1).

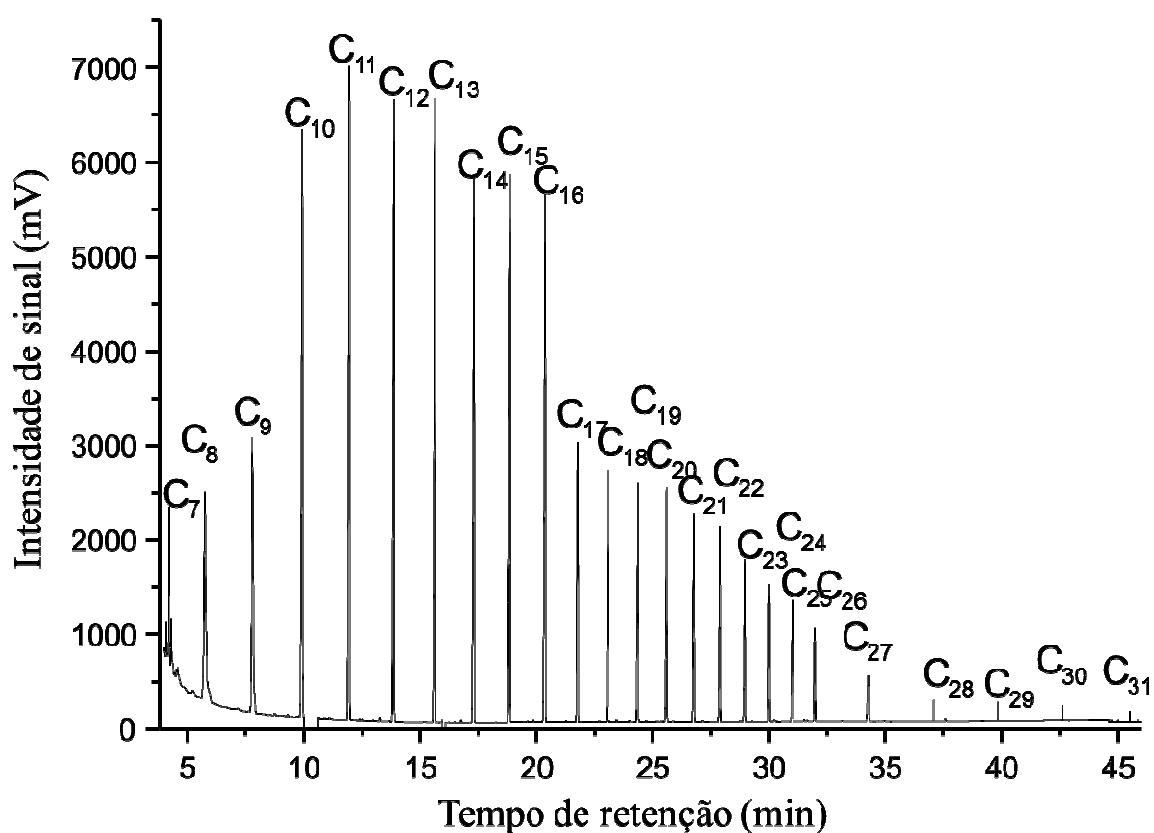


Figura 1- Cromatograma representativo da mistura padrão de alcanos lineares de C₇-C₃₁ analisados por CG-DIC e CG-EM.

Os tempos de retenção médios dos alcanos lineares analisados presentes na mistura padrão são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 -Tempo de retenção dos alcanos lineares de C₇ a C₃₁ por CG-DIC, analisados nos diferentes estágios de desenvolvimento da vespa *P. versicolor*

Alcano	Nomenclatura	T _r (min)* ± DP
C ₇ H ₁₆	n-heptano	4,18 ± 0,21
C ₈ H ₁₈	n-octano	5,74 ± 0,29
C ₉ H ₂₀	n-nonano	7,48 ± 0,39
C ₁₀ H ₂₂	n-decano	9,91 ± 0,50
C ₁₁ H ₂₄	n-undecano	11,95 ± 0,60
C ₁₂ H ₂₆	n-dodecano	13,84 ± 0,69
C ₁₃ H ₂₈	n-tridecano	15,63 ± 0,78
C ₁₄ H ₃₀	n-tetradecano	17,29 ± 0,86
C ₁₅ H ₃₂	n-pentadecano	18,87 ± 0,94
C ₁₆ H ₃₄	n-hexadecano	20,36 ± 1,02
C ₁₇ H ₃₆	n-heptadecano	21,74 ± 1,09
C ₁₈ H ₃₈	n-octadecano	23,09 ± 1,15
C ₁₉ H ₄₀	n-nonadecano	24,37 ± 1,22
C ₂₀ H ₄₂	n-eicosano	25,60 ± 1,28
C ₂₁ H ₄₄	n-heneicosano	26,77 ± 1,34
C ₂₂ H ₄₆	n-docosano	27,89 ± 1,39
C ₂₃ H ₄₈	n-tricosano	28,97 ± 1,45
C ₂₄ H ₅₀	n-tetracosano	30,00 ± 1,50
C ₂₅ H ₅₂	n-pentacosano	31,00 ± 1,55
C ₂₆ H ₅₄	n-hexacosano	31,97 ± 1,60
C ₂₇ H ₅₆	n-heptacosano	34,27 ± 1,71
C ₂₈ H ₅₈	n-octacosano	37,06 ± 1,80
C ₂₉ H ₆₀	n-nonacosano	39,83 ± 1,88
C ₃₀ H ₆₂	n-triacontano	42,61 ± 1,97
C ₃₁ H ₆₄	n-hentriacontano	45,48 ± 2,02

Tr =Tempo de retenção. *média de quintuplicata de injeção. DP=Desvio padrão

Foram identificados 21 alcanos lineares no estágio de ovo (C₈-C₁₀, C₁₄-C₃₁) e 25 alcanos lineares nos demais estágios de desenvolvimento de *P. versicolor* (Figura 2).

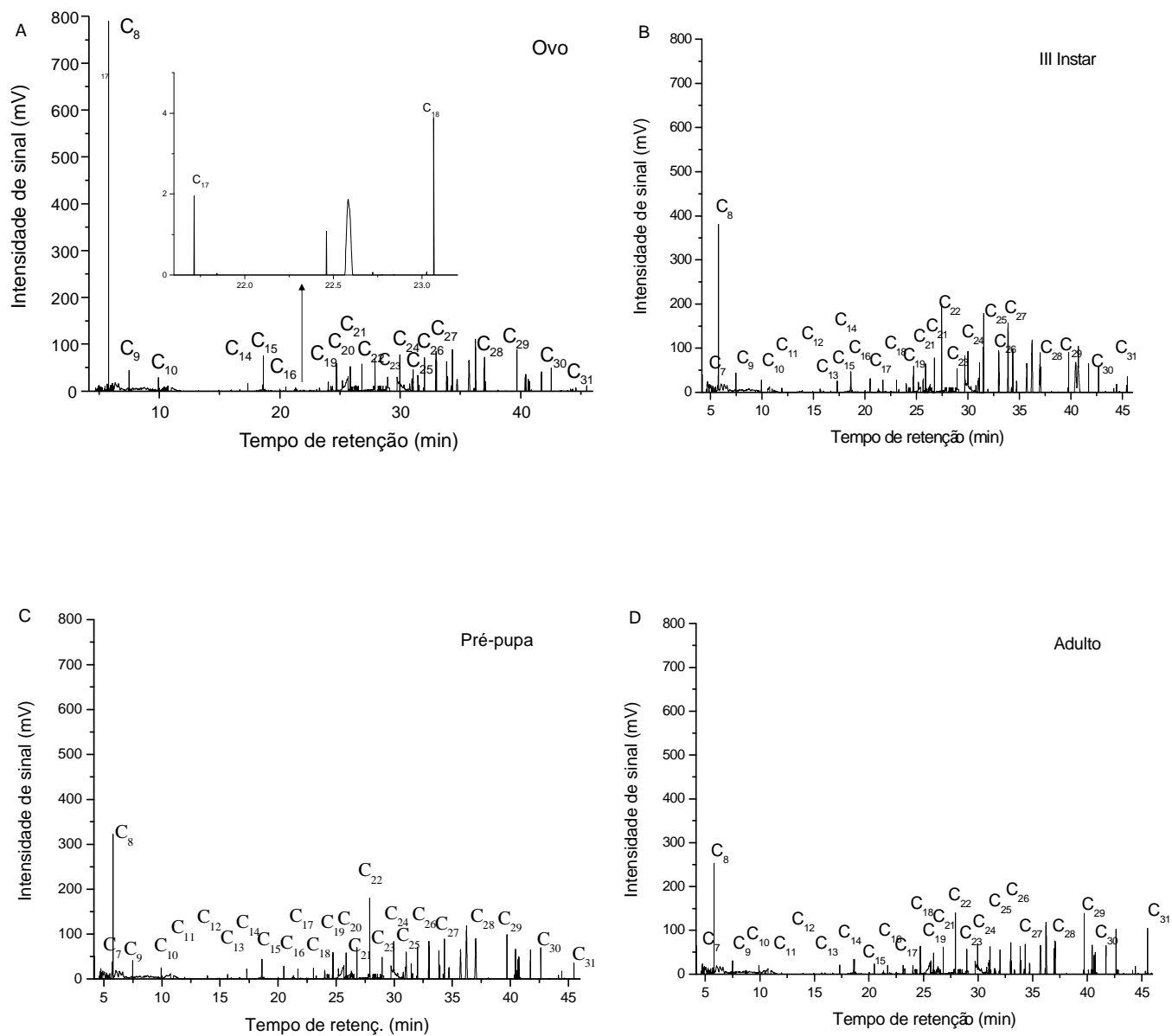


Figura 2: Cromatogramas representativos de A) ovos, B) III ínstar larval, C) pré-pupas e D) adultos de *P. versicolor* obtidos por CG-DIC.

Os valores do desvio padrão relativo em termos de área percentual relativa foram menores que 1% em um mesmo estágio, indicando que não ocorreram diferenças significativas entre as quantidades obtidas para os alcanos lineares em cada estágio de uma mesma colônia.

Analisando cada estágio independentemente e comparando entre as 10 colônias os valores do desvio padrão relativo foram menores que 2,5% indicando que mesmo entre as colônias as diferenças não foram significativas.

Na distinção empregando MANOVA, somente o alcano linear C₂₈ (F= 5,453 e P= 0,020) foi significativo para explicar as diferenças entre as colônias.

De forma geral, as diferenças foram quantitativas para os compostos presentes nos vários estágios de desenvolvimento, sendo que na fase de ovo houve destaque para os alcanos lineares C₈, C₂₄, C₂₇ e C₂₉.

Nos ínstaes larvais destacaram-se quantitativamente os alcanos lineares C₈, C₂₂ e do C₂₄-C₃₀ e também os alcenos, principalmente no quarto e quinto ínstaes larvais.

Nas pré-pupas, pupas e adultos da espécie o C₈, C₂₂, C₂₄, e de C₂₆-C₃₀, além dos alcanos ramificados apresentaram maior área percentual relativa nos últimos estágios de desenvolvimento (Tabelas 2 e 3).

A Tabela 2 mostra os valores de P e F para os alcanos lineares analisados por CG-DIC, bem como os valores médios das áreas percentuais relativas dos vinte e cinco alcanos lineares. Com base nos valores de P e F, somente o C₂₅ e C₂₈ não foram significativos para distinção dos nove estágios de desenvolvimento analisados para *P. versicolor*.

Tabela 2 - Valores de F, P e médias de área percentual relativa de alcanos lineares dos estágios de desenvolvimento de *P. versicolor* para os dados relativos às 10 colônias.

Alcano	Nomenclatura	F	P <	Média dos valores de área percentual relativa										
				Ovo	I ínstar	II ínstar	III ínstar	IV ínstar	V ínstar	Pré-pupa	Pupa	Adulto		
C ₇ H ₁₆	n-heptano	602,496	0,000	0,000	0,121	0,121	0,117	0,139	0,157	0,145	0,163	0,162		
C ₈ H ₁₈	n-octano	417,865	0,000	21,285	10,262	9,886	9,147	8,733	8,487	7,858	7,938	6,830		
C ₉ H ₂₀	n-nonano	2.021,451	0,000	1,107	1,131	1,107	1,057	1,033	1,020	0,982	0,955	0,790		
C ₁₀ H ₂₂	n-decano	6.436,357	0,000	0,560	0,555	0,543	0,519	0,507	0,492	0,465	0,460	0,398		
C ₁₁ H ₂₄	n-undecano	60,396	0,000	0,000	0,112	0,110	0,105	0,103	0,100	0,094	0,106	0,089		
C ₁₂ H ₂₆	n-dodecano	45,058	0,000	0,000	0,004	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003		
C ₁₃ H ₂₈	n-tridecano	22,783	0,000	0,000	0,051	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,033		
C ₁₄ H ₃₀	n-tetradecano	33,059	0,000	0,548	0,878	0,859	0,820	0,802	0,777	0,734	0,706	0,575		
C ₁₅ H ₃₂	n-pentadecano	775,405	0,000	0,510	0,343	0,336	0,320	0,313	0,304	0,288	0,281	0,245		
C ₁₆ H ₃₄	n-hexadecano	27,530	0,000	0,401	1,370	1,340	1,280	1,251	1,214	1,152	1,115	1,179		
C ₁₇ H ₃₆	n-heptadecano	37,793	0,000	0,025	0,319	0,312	0,298	0,291	0,283	0,268	0,271	0,249		
C ₁₈ H ₃₈	n-octadecano	29,174	0,000	0,044	0,303	0,296	0,283	0,277	0,268	0,254	0,251	0,236		
C ₁₉ H ₄₀	n-nonadecano	1.500,977	0,000	0,737	0,796	0,778	0,743	0,727	0,705	0,666	0,659	0,569		
C ₂₀ H ₄₂	n-eicosano	178,523	0,000	0,545	0,689	0,674	0,644	0,629	0,610	0,577	0,583	0,492		
C ₂₁ H ₄₄	n-heneicosano	39,938	0,000	1,412	1,953	1,910	1,824	1,783	1,729	1,633	1,629	1,580		
C ₂₂ H ₄₆	n-docosano	4,475	0,035	1,813	5,314	5,199	4,965	4,852	4,705	4,446	4,321	3,742		
C ₂₃ H ₄₈	n-tricosano	36,496	0,000	0,690	1,286	1,258	1,202	1,174	1,139	1,078	1,126	1,311		
C ₂₄ H ₅₀	n-tetracosano	212,148	0,000	2,625	3,234	3,164	3,022	2,953	2,864	2,707	2,623	2,645		
C ₂₅ H ₅₂	n-pentacosano	2,850	0,092	1,398	2,065	2,020	1,929	1,885	1,828	1,728	1,855	1,893		
C ₂₆ H ₅₄	n-hexacosano	124,797	0,000	1,949	2,451	2,398	2,290	2,238	2,170	2,054	2,022	2,061		
C ₂₇ H ₅₆	n-heptacosano	545,906	0,000	2,483	2,826	2,764	2,640	2,580	2,502	2,366	2,332	2,382		
C ₂₈ H ₅₈	n-octacosano	0,240	0,625	1,869	2,936	2,872	2,743	2,681	2,600	2,458	2,559	2,537		
C ₂₉ H ₆₀	n-nonacosano	1.690,902	0,000	2,612	2,632	2,707	2,699	2,862	2,953	3,750	3,738	4,305		
C ₃₀ H ₆₂	n-triacontano	7.151,163	0,000	1,720	1,885	2,054	2,054	2,170	2,451	2,640	2,936	3,234		
C ₃₁ H ₆₄	n-hentriacontano	3.364,641	0,000	0,235	0,268	0,320	0,657	0,658	0,734	1,398	1,410	1,953		

Pela Tabela 3, os resultados demonstram que há diferenciação entre os vários estágios de desenvolvimento de *P. versicolor*.

Tabela 3- Áreas percentuais relativas de alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos presentes ao longo do desenvolvimento na espécie *P. versicolor* por CG-EM.

	Alcanos lineares F = 5.212,463 P < 0,000	Alcanos ramificados F = 5.312,258 P < 0,000	Alcenos F = 203,490 P < 0,000
Estágio	Média área percentual relativa (± DP)	Média área percentual relativa (± DP)	Média área percentual relativa (± DP)
Ovo	45,64 ±0,36	13,68 ±0,73	7,62 ±0,26
Ínstar I	43,71 ±0,40	15,45 ±0,24	8,99 ±0,46
Ínstar II	42,54 ±0,23	16,61 ±0,35	10,52 ±0,27
Ínstar III	41,18 ±0,40	17,14 ±0,30	11,37 ±0,23
Ínstar IV	40,42 ±0,31	17,70 ±0,23	12,52 ±0,28
Ínstar V	40,32 ±0,54	18,45 ±0,23	12,53 ±0,42
Pré-pupa	39,07 ±0,40	19,61 ±0,39	11,63 ±0,29
Pupa	38,03 ±0,44	20,94 ±0,29	11,52 ±0,25
Adulto	36,32 ±0,65	22,85 ±0,35	11,21 ±1,73

DP= desvio padrão. Média área percentual relativa = dos dados obtidos de 30 amostras.

A Figura 3A mostra que há nove agrupamentos distintos, referentes aos diferentes estágios de desenvolvimento, com Wilk's Lambda de 0,000; F = 248.203,776 e P < 0,000, de acordo com a composição de alcanos lineares. O primeiro PC explicando 59% dos resultados, o segundo PC explicou 37%.

A Figura 3B, resultado das áreas percentuais relativas totais de alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos também mostra os mesmos grupos, com Wilk's Lambda de 0,003; P <

0,000 e $F = 587,758$, com o primeiro PC explicando 83% e juntamente com o segundo PC explicam 98% dos resultados.

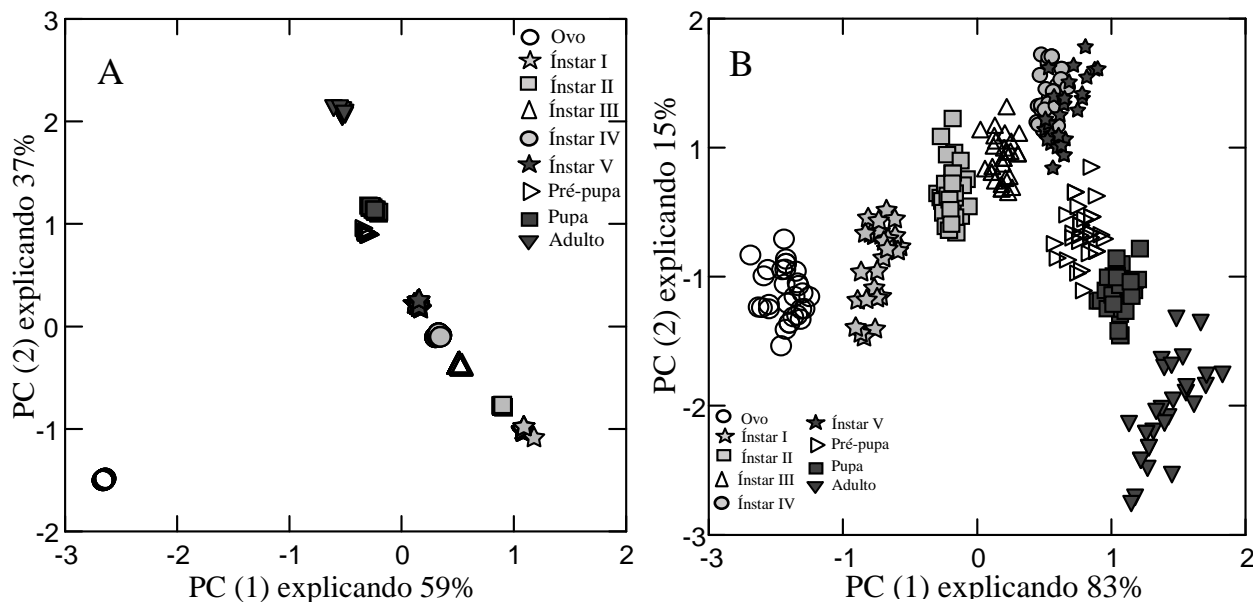


Figura 3: (A) Análise de PCA dos n -alcanos analisados por CG-DIC; (B) alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos analisados por CG-EM ao longo dos estágios de desenvolvimento de *P. versicolor*.

Discussão

Em termos de química cuticular há diferenças significativas entre os vários estágios de desenvolvimento da espécie, porém não há diferenças significativas quando se compara cada estágio entre as 10 colônias (Figura 3). Essa similaridade pode ser explicada pelo fato de terem sido colônias que estavam nidificadas em uma mesma área o que de fato, implicaria em colônias com nível de parentesco próximo, resultando, portanto, em uma química cuticular relativamente semelhante. Além disto, pode ser relevante os componentes ambientais (Young & Schal, 1997), uma vez que os componentes exógenos, provenientes da alimentação, do substrato do ninho entre outros, também são responsáveis pela composição química da cutícula, o que reforçaria

estas semelhanças (Liang & Silverman, 2000; Silverman & Liang, 2001; Sorvari et al., 2008; Zweden et al., 2009).

De fato, Brown et al. (1991) encontraram semelhanças qualitativas entre a composição dos hidrocarbonetos cuticulares obtidos de diferentes colônias de mesma população de *Vespula germanica*, mas mostraram diferenças quantitativas nas proporções de alcanos lineares, alcenos e alcanos ramificados na análise cuticular dessa espécie.

Por outro lado, Dapporto et al. (2004) analisando hidrocarbonetos ramificados, alcanos saturados e insaturados presentes na cutícula de adultos de colônias de *Polistes dominulus* de diferentes populações observaram que colônias de uma mesma população apresentavam maior similaridade na composição química cuticular em detrimento daquelas de outras áreas.

Por outro lado, tanto os alcanos lineares, quanto alcanos ramificados e alcenos são importantes para definir os diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 3 A e B).

Estes resultados são corroborados pelos de Cotoneschi et al. (2009) que analisando larvas de vespas *P. dominulus* encontrou além de alcanos lineares, compostos como alcanos ramificados e n-alcenos. Estes compostos também foram importantes para distinguir a assinatura química de larvas, pupas e adultos de moscas *Calliphora vomitoria* (Gołebiowski et al., 2013) e de vespas parasitoides *Dibrachys cavus* de diferentes idades (Ruther et al., 2011).

Deve-se destacar que no estágio de ovo não foram identificados os alcanos lineares C₇, C₁₁, C₁₂ e C₁₃ (Figura 2A), além de uma menor quantidade de alcanos ramificados e de alcenos sendo, portanto, que a ausência destes compostos define o estágio de ovo, nesta espécie.

Yoon et al. (2012), em estudo com o percevejo *Riptortus pedestris*, verificou diferenças qualitativas na composição cuticular de ovos e demais estágios de desenvolvimento, sendo que somente no estágio de ovo, por exemplo, não foram detectados os compostos C₂₈ e C₃₀.

Parte das diferenças encontradas entre ovos e os demais estágios de desenvolvimento pode ser explicada com base nas substâncias presentes na glândula de Dufour (Billen, 2008), que ajudam na diferenciação de ovos de diferentes castas. De acordo com Bonckaert et al. (2012) em estudo com *Vespula vulgaris*, a composição cuticular do ovo é similar ao perfil químico cuticular da fêmea ovipositora e também ao da glândula de Dufour dessa fêmea.

Ayasse et al. (1999) avaliando a composição química cuticular de rainhas, operárias e ovos postos por ambas as castas, além de amostras da glândula de Dufour em *Bombus terrestris*, encontraram diferenças tanto na composição química do estágio de ovo de rainhas e operárias, quanto dos adultos. Também identificaram semelhanças entre os perfis químicos cuticulares da fase de ovo e das glândulas de Dufour dos adultos. Ainda, segundo Dapporto et al. (2007) o perfil químico cuticular do ovo está relacionado com o grau de desenvolvimento ovariano das fêmeas ovipositoras.

Entre os alcanos lineares, os mais significativos para distinguir quantitativamente os diferentes ínstares larvais foram os C₈, C₂₂ e do C₂₄-C₃₀ (Tabela 2). Por outro lado os C₂₂, C₂₄, C₂₆, C₂₇ e o C₂₈ foram mais pronunciados quantitativamente nas larvas do que nos outros estágios.

Brown et al. (1991) também determinaram diferenças quantitativas entre alguns alcanos lineares de larvas e adultos de *V. germânica*, com o C₂₇ e C₂₉. Cotoneschi et al. (2007) em estudo similar com *P. dominulus* encontraram diferenças qualitativas e quantitativas nos compostos presentes na cutícula de larvas e adultos, sendo que as larvas apresentaram alcanos lineares de C₂₂-C₃₄ e adultos de C₂₃-C₃₆, ainda neste mesmo estudo foi constatado que os alcanos lineares foram mais abundantes nas larvas, e nos adultos houve maior quantidade de alcanos ramificados.

Pré-pupas, pupas e adultos se diferenciaram pelas variações quantitativas, com redução de alcanos lineares e aumento significativos de alcanos ramificados e de alcenos. Evidenciando

que ocorre uma evolução na assinatura cuticular de *P. versicolor* ao longo de todo seu desenvolvimento.

Dapporto et al. (2008), além disto observaram que na cutícula de *P. dominulus* há um aumento quantitativo significativo de alcanos ramificados após a emergência do adulto. Neves et al. (2012) também observaram que adultos da vespa social *Mischocyttarus consimilis* somente adquire a sua total assinatura química, cinco dias após sua emergência, devido as interações sociais e com o próprio substrato do ninho.

De fato, variações quantitativas de alcanos lineares, assim como ramificados, e de alcenos lineares foram descritas por Lorenzi et al. (2004) entre pupas e adultos de *P. dominulus* e em *V. germanica* (Brown et al, 1991).

Conclusão

Ao longo do ciclo de desenvolvimento dos indivíduos desta espécie ocorrem variações significativas dos compostos químicos da cutícula. A variação em relação aos alcanos lineares é quantitativa, uma vez que a maioria deles está presente em todos os estágios, com exceção de alguns que caracterizam exclusivamente o estágio de ovo. Com relação aos alcanos ramificados e alcenos, estes variaram também mais significativamente em termos quantitativos, e aumentam seus teores ao longo do desenvolvimento da vespa, indicando um aumento da complexidade ao longo do crescimento do inseto. Contudo, não há variação significativa entre diferentes colônias, provavelmente porque estas são de uma mesma população, o que implica que elas podem apresentar relações próximas de parentesco e estão expostos aos mesmos fatores ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, 2001. 456 p.
- AYASSE, M.; BIRNBAUM, J.; TENGO, J.; DOORN, A. V.; TAGHIZADEH, T.; FRANCKE, W. Caste- and colony-specific chemical signals on eggs of the bumble bee, *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). **Chemoecology**, v. 9, p.119–126, 1999.
- BILLEN, J. A importância de glândulas exócrinas na sociedade de insetos. In: **Insetos Sociais: Da biologia à aplicação**. Belo Horizonte: UFV, 2008. p.87-92.
- BLOMQUIST, G. J.; BAGNÈRES, A-G. **Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology**, Cambridge University Press, 2010. 506 p.
- BONCKAERT, W.; DRIJFHOUT, F. P.; D'ETTORRE, P.; BILLEN, J.; WENSELEERS, T. Hydrocarbon signatures of egg maternity, caste membership and reproductive status in the common wasp. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, p.42–51, 2012.
- BOS, N.; DREIER, S.; JØRGENSEN, C. G.; NIELSEN, J.; FERNANDO J. GUERRIERI, F. J.; D'ETTORRE, P. Learning and perceptual similarity among cuticular hydrocarbons in ants. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p.138–146, 2012.
- BROWN, W. V.; SPRADBERRY, J. P.; LACEY, M. J. Changes in the cuticular hydrocarbon composition during development of the social wasp, *Vespula germanica* (F.) (Hymenoptera: vespidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 99B, n. 3, p. 553-562, 1991.
- CAMARGO, R. C. R. **Produção de mel**. Teresina- PI, Embrapa Meio-Norte, 2002.138 p.

- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: Editora UNICAMP, 2006. 453 p.
- COSTANZI, E.; BAGNÈRES, A-G.; LORENZI, M. C. Changes in the hydrocarbon proportions of colony odor and their consequences on nestmate recognition in social wasps. **Plos One**, v. 8, n. 5, p. 1-11, 2013.
- COTONESCHI, C.; DANI, F. R.; CERVO, R.; SLEDGE, M. F.; TURILLAZZI, S. *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) larvae possess their own chemical signatures. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p. 954–963, 2007.
- COTONESCHI, C.; DANI, F. R.; CERVO, R.; SCALA, C.; STRASSMANN, J. E.; QUELLER, D. C.; TURILLAZZI, S. *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae) larvae show different cuticular patterns according to their Sex: workers seem not use this Chemical information. **Chemical Senses**, v.34, p.195–202, 2009.
- DAPPORTO, L.; THEODORA, P.; SPACCHINI, C.; PIERACCINI, G.; TURILLAZZI, S. Rank and epicuticular hydrocarbons in different populations of the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera, Vespidae). **Insectes Sociaux**, v. 51, p. 279–286, 2004.
- DAPPORTO, L.; SLEDGE, F. M.; TURILLAZZI, S. Dynamics of cuticular chemical profiles of *Polistes dominulus* workers in orphaned nests (Hymenoptera, Vespidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 51, p. 969–973, 2005.
- DAPPORTO, L.; DANI, F. R.; TURILLAZZI, S. Social dominance molds cuticular and egg chemical blends in a paper wasp. **Current Biology**, v.17, n.13, p. 504- 505 R, 2007.
- DAPPORTO, L.; LAMBARDI, D.; TURILLAZZI, S. Not only cuticular lipids: First evidence of differences between foundresses and their daughters in polar substances in the paper wasp *Polistes dominulus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p.89–95, 2008.

- DAPPORTO, L.; LIEBERT, A. E.; STARKS, P. T.; TURILLAZZI, S. The relationships between cuticular hydrocarbon composition, faunal assemblages, inter-island distance, and population genetic variation in Tuscan Archipelago wasps. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 341–348, 2009.
- DEVIGNE, C. & BISEAU, J. C. The differential response of workers and queens of the ant *Lasius niger* to an environment marked by workers: Ants dislike the unknown. **Behavioural Processes**, v. 91, p. 275–281, 2012.
- FERREIRA-CALIMAN, M. J.; NASCIMENTO, F. S.; TURATTI, I. C.; MATEUS, S.; LOPES, N. P.; ZUCCHI, R. The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. **Journal of Insect Physiology**, v.56, p. 800–804, 2010.
- FERREIRA-CALIMAN, M. J.; FALCÓN, T.; MATEUS, S.; ZUCCHI, R.; NASCIMENTO, F. S. Chemical identity of recently emerged workers, males, and queens in the stingless bee *Melipona marginata*. **Apidologie**, v. 44, p. 657-665, 2013.
- FERREIRA, A.C.; CARDOSO, C.A.L.; NEVES, E.F.; SÚAREZ, Y.R.; ANTONIALLI-JUNIOR, W.F. Distinct linear hydrocarbon profiles and chemical strategy of facultative parasitism among *Mischocyttarus* wasps. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.4, p. 4351-4359, 2012.
- GAMBOA, G. J.; GRUDZIEN, T. A.; ESPELIE, K. E.; BURA, E. A. Kin recognition pheromones in social wasps: combining chemical and behavioural evidence. **Animal Behaviour**, v. 51, n. 3, p.625–629, 1996.
- GAMBOA, G. J. Kin recognition in eusocial wasps. **Annales Zoologici Fennici**. v. 41, p. 789–808, 2004.

- GOŁEBIOWSKI, M.; PASZKIEWICZ, M.; GRUBBA, A.; GASIEWSKA, D.; BOGUS, M. I.; WŁÓKA, E.; WIELOCH, W.; STEPNOWSKI, P. Cuticular and internal n-alkane composition of *Lucilia sericata* larvae, pupae, male and female imagines: application of HPLC-LLSD and GC/MS-SIM. **Bulletin of Entomological Research**, v.102, p. 453–460, 2012.
- GOŁEBIOWSKI, M.; CERKOWNIAK, M.; BOGUS, M. I.; WŁÓKA, E.; DAWGUL, M.; KAMYSZ, W.; STEPNOWSKI, P. Free fatty acids in the cuticular and internal lipids of *Calliphora vomitoria* and their antimicrobial activity. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, p. 416–429, 2013.
- GOODPASTER, A. M.; & KENNEDY, M. A. Quantification and statistical significance analysis of group separation in NMR-based metabonomics studies. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 109, p.162–170, 2011.
- GULLAN, P. J. & CRANSTON, P. S. **The Insects: an outline of entomology**. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell, 2010. 565 p.
- HOWARD, R. W. & BAKER, J. E. Stage-specific surface chemicals of *Plodia interpunctella*: 2-acyl-1,3-cyclohexanediones from larval mandibular glands serve as cuticular lipids. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 138B, p.193–206, 2004.
- KRASNEC, M.O.; BREED, M. D. Colony-Specific Cuticular Hydrocarbon Profile in *Formica argentea* Ants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p.59–66, 2013.
- KROISS, J.; SVATOŠ, A.; KALTENPOTH, M. Rapid identification of insect cuticular hydrocarbons using Gas Chromatography—Ion-Trap Mass Spectrometry. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, p. 420–427, 2011.

- LIANG, D. & SILVERMAN, J. “You are what you eat”: Diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. **Naturwissenschaften**, v. 87, p. 412–416, 2000.
- LOCKEY, K. H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparative Biochemistry and Physiology – Parte B**, v. 89, p. 595-645, 1988.
- LOMMELEN, E.; JOHNSON, C. A.; DRIJFHOUT, F. P.; BILLEN, J.; GOBIN, B. Egg marking in the facultatively queenless ant *Gnamptogenys striatula*: The source and mechanism. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p.727–736, 2008.
- LORENZI, M. C.; SLEDGE, M. F.; LAIOLO, P.; STURLINI, E.; TURILLAZZI, S. Cuticular hydrocarbon dynamics in young adult *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) and the role of linear hydrocarbons in nestmate recognition systems. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 935–941, 2004.
- LORENZI, M. C.; CERVO, R.; BAGNÈRES, A-G. Facultative social parasites mark host nests with branched hydrocarbons. **Animal Behaviour**, v. 82, p.1143-1149, 2011.
- LUCAS, C.; PHO, D.B.; JALLON, J.M.; FRESNEAU, D. Role of cuticular hydrocarbons in the chemical recognition between ant species in the *Pachycondyla villosa* species complex. **Journal of Insect Physiology**, v. 51, p. 1148–1157, 2005.
- NAGAMATI JUNIOR, K.; SIMOKOMAKI, K.; GRUBER, C. V.; DEL LAMA, M. A. Sociogenetic structure of *Polistes* (Aphanilopterus) *versicolor* Olivier, 1791 colonies (Hymenoptera, Vespidae, Polistini). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n.4, p. 669-675, 2010.
- NEVES, E.F.; ANDRADE, L.H.C.; SÚAREZ, Y.R.; LIMA, S.M.; ANTONIALLI-JUNIOR, W.F. Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus*

- consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 1891-1898, 2012.
- OLANIRAN, O. A.; SUDHAKAR, A. V. S.; DRIJFHOUT, F. P.; DUBLON, I. A. N.; HALL, D. R.; HAMILTON, J. G. C.; KIRK, W. D. J. A male-predominant cuticular hydrocarbon, 7-methyltricosane, is used as a contact pheromone in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. **Journal of Chemical Ecology**, v.39, p.559–568, 2013
- PINHEIRO, R. P.; RIBEIRO B.; ZERINGOTÁ, V.; SOUZA, A. R.; PREZOTO F. Técnica alternativa para determinação do sexo larval na vespa social *Polistes versicolor*. In: X Congresso de Ecologia do Brasil, 792. 2011, São Lourenço. **Anais...Minas Gerais: Sociedade de Ecologia do Brasil**, 2011. p.1-2.
- PREZOTO, F. & GOBBI, N. Morfometria dos estágios imaturos de *Polistes simillimus* Zikán, 1951 (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 7, n. 1, p. 47-54, 2005.
- RICHARDS, O. W. **The species of America, Excluding the Vespinae**. London: British Museum (Natural History). 1978. 580 p.
- RODRIGUES, V. M. **Estudo sobre vespas sociais do Brasil (Hymenoptera, Vespidae)**. 1968. 113 p. Tese (Doutorado em Zoologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, Rio Claro, 1968.
- RUTHER, J.; DÖRING, M.; STEINER, S. Cuticular hydrocarbons as contact sex pheromone in the parasitoid *Dibrachys cavus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.140, p.59–68, 2011.
- SAID, I.; COSTAGLIOLA, G.; LEONCINI, I.; RIVAULT, C. Cuticular hydrocarbon profiles and aggregation in four *Periplaneta* species (Insecta: Dictyoptera). **Journal of Insect Physiology**, v. 51, p. 995–1003, 2005.

- SHAH, V. P.; DIGHE, K. K. S.; MCGILVERY, I.; SKELLY, J. P.; YAKOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C. T.; COOK, C. E.; MCDOWALL, R. D.; PITTMAN, K. A.; SPECTOR, S. Analytical methods validation: Bioavailability, bio- equivalence, and pharmacokinetic studies. **Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 588-592, 1992.
- SILVERMAN, J. & LIANG, D. Colony disassociation following diet partitioning in a unicolonial ant. **Naturwissenschaften**, v.88, p. 73–77, 2001.
- SORVARI, J.; THEODORA, P.; TURILLAZZI, S.; HAKKARAINEN, H.; SUNDSTROM, L. Food resources, chemical signaling, and nestmate recognition in the ant *Formica aquilonia*. **Behavioral Ecology**, v.19, p. 441–447,2008.
- TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 452 p.
- VIEIRA, E. O.; PRATES, H. T.; PEREIRA, J.R. B.; SILVA, G. F.; DUARTE, F. V.; NERES, P. M. Avaliação da contaminação do carbofuran nos solos do Distrito de Irrigação do Gortuba. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.3, p.250–256, 2009.
- VILELA, E. F. & DELLA LÚCIA, T. M. C. **Feromônios de insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1987. 155 p.
- YOON, C.; YANG, J-O.; YOUN, Y-N.; KIM, G-H. Changes in cuticular hydrocarbons in different developmental stages of the bean bug, *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 15, p. 579–587, 2012.
- YOUNG, H. P. & SCHAL, C. Cuticular hydrocarbon synthesis in relation to feeding and developmental stage in nymphs of *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 90, n. 5, p.655-663, 1997.

- ZARBIN, P.H. G. & RODRIGUES, M. A. C. M. Feromônios de insetos: Tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.722-731, 2009.
- ZWEDEN, J. S. V.; DREIER, S.; D'ETTORRE, P. Disentangling environmental and heritable nestmate recognition cues in a carpenter ant. **Journal of Insect Physiology**, v.55, p.158–163, 2009.
- WILSON, E. O. **The insect societies**. Cambridge, Belknap Press, 1971. 548 p.

CAPÍTULO 2 - ANÁLISE CUTICULAR DE AGREGADOS DE VESPAS *Polistes versicolor* EMPREGANDO CG-DIC E FTIR-PAS

Resumo

As fêmeas de vespas como de *Polistes versicolor* podem se juntar em agregações para enfrentar mudanças drásticas de temperatura que ocorrem durante o inverno. Nessas interações ocorrem principalmente por comunicação química e são realizadas por feromônios superficiais presentes na cutícula do inseto. O objetivo deste estudo foi analisar a composição cuticular de fêmeas de *Polistes versicolor* em sistema de agregação empregando as técnicas de cromatografia gasosa e a espectroscopia óptica de absorção fotoacústica por transformada de Fourier. Fêmeas oriundas de agregados distintos se diferenciaram pela química de sua cutícula. Nos agregados houve uma distinção na composição química cuticular entre fêmeas com diferentes graus de desenvolvimento ovariano, bem como foi possível diferenciar fêmeas fecundadas de não fecundadas.

Palavras-chave: insetos sociais, compostos cuticulares, assinatura química.

Introdução

As vespas Polistinae podem apresentar fundações independentes que podem ocorrer por haplometrose, quando as colônias são fundadas por um única rainha, ou por pleometrose, quando são fundadas por duas ou mais (Jeanne, 1991; Nagamati Junior et al, 2010). De forma que quando colônias são fundadas por várias fêmeas potenciais poedeiras, ocorre a dominância reprodutiva através de comportamentos hierárquicos, mediados por processos agonísticos (Pardi, 1948; West-Eberhard, 1969; Oliveira & Hölldobler, 1990; Ross & Matthews, 1991).

Os agregados ocorrem quando normalmente as condições climáticas não são as mais adequadas para que fundem e ou mantenham suas colônias (Tannure & Nascimento, 1999), dessa forma os indivíduos adultos se unem para passar esse período (González et al., 2002; Gobbi et al., 2006). Após este período ocorrem as dispersões das fêmeas e o indicativo é um número elevado de novas fundações (Gobbi et al., 2009).

As interações entre os indivíduos em agregados, do mesmo modo que em outras associações, são permeadas por compostos químicos como os feromônios (Cotoneschi et al., 2007; Dapporto et al., 2008; Lorenzi et al., 2011). Os feromônios são definidos como sendo uma mistura de compostos químicos que ao serem secretados por um animal e liberados no meio ambiente, provocam uma reação específica no indivíduo receptor (Paiva & Pedrosa-Macebo, 1985), sendo classificados de acordo com suas funções de orientação no inseto (Vilela & Della Lúcia, 1987).

Dentre os feromônios, existem aqueles denominados de superficiais, encontrados na cutícula do inseto (Lockey, 1988; Gullan & Cranston, 2010). Vários estudos apontam que os compostos que compõem a cutícula dos insetos são basicamente hidrocarbonetos, principalmente

alcanos, alcanos ramificados e alcenos (Howard & Baker, 2004; Dapporto et al., 2005; Devigne & Biseau, 2012; Gofębiowski et al., 2013; Olaniran et al., 2013).

Os hidrocarbonetos cuticulares, além de ajudarem na diferenciação de castas (Lorenzi et al, 2004; Zarbin & Rodrigues, 2009; Ferreira-Caliman et al, 2013), espécies e companheiros de ninho (Bos et al., 2012; Costanzi et al., 2013), podem ser também um importante indicativo de dominância, bem como sinal de fertilidade (Bonavita-Cougourdan et al., 1991; Cuvillier-Hot et al., 2001; Sledge et al., 2001; Hannonen et al., 2002; Howard & Blomquist, 2005).

De acordo com Biseau et al. (2004) os hidrocarbonetos cuticulares de adultos podem variar de acordo com o desenvolvimento ovariano, bem como, com a fecundação, como é o caso de formigas *Linepithema humile*, onde foram identificadas diferenças nos perfis químicos cuticulares entre fêmeas fecundadas e não fecundadas. Para Cuvillier-Hot et al. (2001) em estudo com formigas *Diacamma ceylonense*, os perfis cuticulares podem variar de acordo com a fertilidade do inseto.

Com base no número reduzido de trabalhos da literatura em relação a agregações de inverno, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição cuticular dos indivíduos em sistema de agregação empregando as técnicas de cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC) e a espectroscopia óptica de absorção fotoacústica por transformada de Fourier (FTIR-PAS).

Materiais e Métodos

Coleta de material

Para a realização deste estudo foram avaliadas 69 fêmeas em dois agregados de inverno da vespa *P. versicolor* coletados no município de Dourados/MS (S 22° 12' 43''; W 54° 54' 53'') entre abril de 2012 e maio de 2013.

Após a coleta, os abdomens das fêmeas foram fixados individualmente em álcool etílico absoluto (VETEC, 99,8%), mantidos em tubos eppendorf e armazenados a 4°C para posterior análise do desenvolvimento ovariano e fecundação. O tórax de cada indivíduo foi extraído e pesado utilizando balança analítica SHIMADZU (modelo AY220) e em seguida identificado e conservado por congelamento para posterior análise dos compostos cuticulares, usando FTIR-PAS e CG-DIC.

O gáster de cada indivíduo foi dissecado para avaliar o grau de desenvolvimento ovariano e fecundação das fêmeas.

Análise da fisiologia reprodutiva

Para a realização da análise da condição ovariana, foram dissecados os abdomens das fêmeas e seus ovários foram esquematizados para o estabelecimento dos padrões de desenvolvimento ovariano, com auxílio de estereomicroscópio Zeiss Stemi 2000-C, equipado com ocular micrométrica e câmera digital.

A classificação do estágio de desenvolvimento dos ovários foi realizada de acordo com o grau de desenvolvimento dos ovários (Baio et al, 2004). Sendo o primeiro grau definido pela presença de ovários filamentosos, o segundo com ovários ligeiramente intumescidos, o terceiro com ovários mostrando oócitos maduros (Oliveira et al, 2007; Gobbi et al, 2006) e o quarto apresentando ovários grandes com oócitos bem desenvolvidos (Gobbi et al, 2006).

Para avaliar se as fêmeas estavam fecundadas, foi usado o reagente colorimétrico fucsina básica P.A sobre a espermateca, que adquire coloração opaca ou perolada na presença de espermatozoides (Noda et al., 2003).

Análise por FTIR-PAS

Cada tórax foi colocado em dessecador a vácuo por 48 horas, para eliminação da umidade que é um fator que pode interferir no espectro gerado pela técnica de FTIR - PAS. A análise foi padronizada para a avaliação dos compostos cuticulares do tórax, uma vez que os abdomens foram destruídos para a análise do grau de desenvolvimento ovariano e condição da espermateca. Os espectros resultantes da FTIR-PAS, obtidos em um Espectrofotômetro Thermo-Nicolet Nexus 670, combinado com um detector Fotoacústico (MTEC-300).

Cada amostra de tórax foi depositada no suporte da célula fotoacústica e purgada com gás Hélio. Da leitura resultante foi obtido a curva da média de 128 espectros para cada tórax estudado com resolução de 16 cm^{-1} . Foram selecionados os principais picos de absorção compreendidos entre 400 e 4000 cm^{-1} , região espectral do infravermelho médio (Pavia et al., 2010) e que contém vibrações das ligações químicas.

Extração

Após os tórax terem sido analisados por FTIR-PAS, os mesmos foram submetidos ao processo de extração para posterior análise por CG-DIC.

Os compostos cuticulares, do tórax, foram extraídos com 1 mL de hexano (grau HPLC, Tedia), empregando banho ultrassônico por 2 minutos e o solvente foi eliminado em capela de exaustão. O extrato foi dissolvido em $50\text{ }\mu\text{L}$ de hexano para as análises cromatográficas.

Análise por CG-DIC

A mistura padrão de alcanos lineares (C₇-C₃₁, SIGMA ALDRICH com pureza $\geq 90\%$) na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e as amostras foram analisados empregando um cromatógrafo à gás com detector de ionização em chama (Thermo Scientific – Focus GC, San Jose, CA, USA), com coluna capilar OV-5 (Ohio Valley Specialty Company, Marietta, OH, USA) 5% fenil dimetilpolisiloxano (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 μm de espessura). Injeção de 1 μL em modo splitless. Temperaturas do injetor e detector de 280°C, usando N₂ como gás carregador (99,999% e velocidade de fluxo de 1,0 mL min^{-1}). Rampa de aquecimento com temperatura inicial de 50 °C por três minutos e alcançando 280°C à 8°C min^{-1} , e permanecendo à 280°C por 15 minutos. Os cromatogramas foram registrados pelo programa Chrom Quest 5.0 e analisados pelo programa Workstation Chrom Data Review.

Tratamento dos dados

Para as amostras analisadas por FTIR-PAS, as identificações dos picos foram realizados de acordo com Antonialli-Junior et al. (2007), Antonialli-Junior et al. (2008) e Neves et al. (2012).

Os alcanos lineares analisados por CG-DIC foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões de C₇-C₃₁ e seus teores foram expressos em área percentual relativa.

Análises estatísticas

Os valores das intensidades de picos obtidas por FTIR-PAS e os valores de área percentual relativa dos alcanos lineares analisados por CG-DIC foram submetidos à análise de variância multivariada (MANOVA) e análise discriminante multivariada empregando o Software

SYSTAT 12. Após a análise estatística os dados selecionados foram Wilk's lambda, F e P. O Wilk's lambda é um parâmetro da medida da diferença entre os grupos, sendo que valores próximos de 0 (zero) indicam que não há sobreposição dos grupos e valores próximos de 1 (um) indicam alta sobreposição entre os grupos (Vieira et al, 2009). Altos valores de F mostram uma maior significância dos dados e P é empregado para indicar se os dados são significativos ou não, sendo que valores menores que 0,05 são significativos (Triola, 2008; Goodpaster & Kennedy, 2011).

Resultados e discussão

A tabela 1 mostra as condições de desenvolvimento ovariano e espermateca de cada fêmeas dos dois agregados.

Tabela 1- Classificação das fêmeas de agregados de inverno de *P. versicolor*

Agregado	Estágio de desenvolvimento ovariano (EDO)			Espermateca		Total de fêmeas
	1° EDO	2° EDO	3° EDO	Fecundada (Fe)	Não Fecundada (NF)	
A1	52,5 %	40,0%	7,5%	15,0%	85,0%	40
A2	48,3%	48,3%	3,4%	17,2%	82,8%	29

A1 = agregado 1; A2 = agregado 2.

No A1, 15% das fêmeas estavam fecundadas sendo que deste total, 33,3% tinha ovários classificados como primeiro EDO (Figura 1A), 50% no segundo EDO (Figura 1B) e 16,7% no terceiro estágio de desenvolvimento ovariano (Figura 1C).

No A2, 17,2% das fêmeas estavam fecundadas, sendo que desta porcentagem, 80% tinha ovários com grau de desenvolvimento do tipo 1 e 20 % do tipo 2 (TABELA 1).

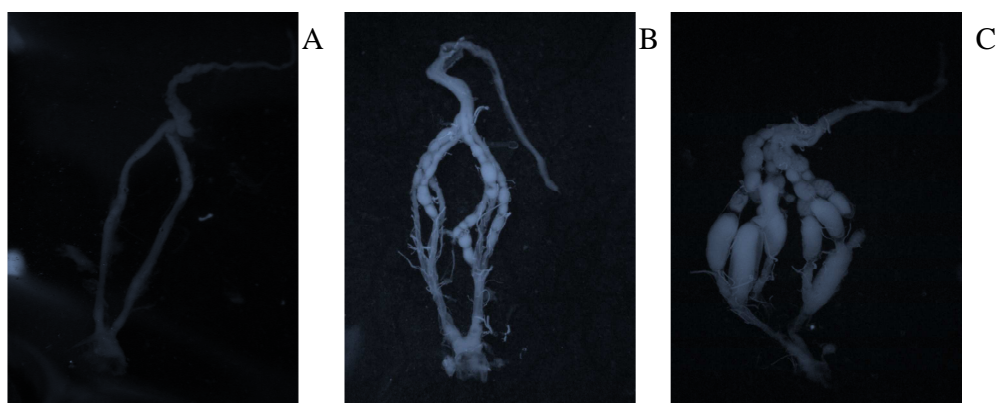


Figura 1- imagens dos estágios de desenvolvimento ovariano de fêmeas de dois agregados de vespas *P. versicolor*. A) primeiro estágio de desenvolvimento ovariano; B) segundo estágio de desenvolvimento ovariano; C) terceiro estágio de desenvolvimento ovariano.

Na Tabela 2 estão dispostos os valores dos números de onda correspondente a cada pico identificado nas amostras de tórax de *P. versicolor*.

Tabela 2 -Valores dos nº de ondas de espectros de absorção no infravermelho médio, grupo funcional e formas de vibração dos tórax de fêmeas de *P. versicolor*

Pico	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Forma de vibração
1	3409	-OH ou -NH	Banda
2	3293	-NH	Estiramento
3	3101	-OH ou -NH	Banda
4	2923	-CH ₂	Estiramento
5	2854	-CH ₂	Estiramento simétrico
6	1743	-C=O	Estiramento
7	1650	-C=O ou -C=N	Estiramento
8	1542	-N-H	Banda
9	1457	-CH ₃	Banda assimétrica
10	1380	-CH ₃	Banda simétrica
11	1241	-CN	Estiramento
12	1157	-CH	Estiramento esqueleto
13	1110	-CH	Estiramento esqueleto
14	1072	-CH	Estiramento esqueleto
15	1033	-CH	Estiramento esqueleto

Na tabela 3 estão dispostos os valores médios de intensidade de sinal de cada pico selecionado a partir das análises de FTIR-PAS, bem como os valores de P e F obtidos pelo teste estatístico MANOVA.

Tabela 3 – valores médios da intensidade de sinal fotoacústico, P e F para agregados, desenvolvimento ovarino e espermateca dos agregados de *P. versicolor*.

Pico	Média da Intensidade de sinal	Agregados		EDO		Espermateca	
		F	P <	F	P <	F	P <
1	3,3231	18,950	0,000	11,566	0,001	0,425	0,517
2	3,8185	29,109	0,000	12,804	0,001	0,786	0,379
3	2,3671	13,288	0,001	7,354	0,009	1,046	0,310
4	3,1294	56,970	0,000	2,446	0,123	0,247	0,621
5	2,2526	69,252	0,000	3,901	0,053	0,469	0,496
6	1,6198	51,688	0,000	7,841	0,007	1,268	0,264
7	4,1205	56,784	0,000	9,600	0,003	0,699	0,406
8	3,5126	28,161	0,000	0,068	0,795	1,001	0,321
9	2,7685	17,311	0,000	6,712	0,012	0,579	0,449
10	2,5805	0,907	0,344	3,162	0,080	0,368	0,546
11	2,3072	3,440	0,068	3,612	0,062	0,764	0,385
12	2,2654	20,837	0,000	7,141	0,010	1,525	0,221
13	2,1037	26,695	0,000	7,272	0,009	1,002	0,321
14	2,2903	10,821	0,002	6,503	0,013	0,725	0,398
15	2,1199	10,450	0,002	6,554	0,013	0,370	0,545

A Figura 2 são os espectros obtidos por FTIR-PAS com os 15 picos identificados e compreendidos entre 4000 e 400 cm^{-1} referentes a possíveis vibrações de hidrocarbonetos e outros grupos funcionais descritos na (Tabela 2).

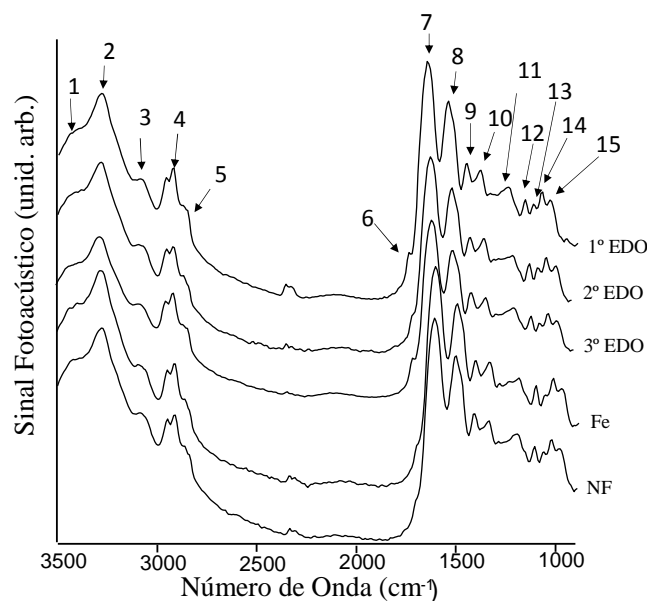


Figura 2- Espectros no infravermelho médio representativo da cutícula de fêmeas de dois agregados de vespas *P. versicolor*.

Os grupos funcionais compreendidos entre 4000 e 400 cm^{-1} estão relacionadas tanto com a queratina quanto com os hidrocarbonetos presentes na cutícula de insetos sociais como *Ectatomma vizottoi* (Antoniali-Junior et al., 2007) e de vespas *Mischocyttarus consimilis* (Neves et al, 2012).

Sendo que, dos 15 picos selecionados, 8 deles são de grupos funcionais pertencentes a hidrocarbonetos (Tabela 2). Entre os picos selecionados, somente dois (1380 e 1241 cm^{-1}) não foram significativos para diferenciar os dois agregados (Tabela 3).

Por CG-DIC foram analisados 25 alcanos lineares com cadeia carbônica variando entre C_7 - C_{31} , os picos na Figura 3 representam esses compostos, presentes na mistura padrão, onde seus tempos de retenção foram usados para comparar com as amostras analisadas por esta técnica.

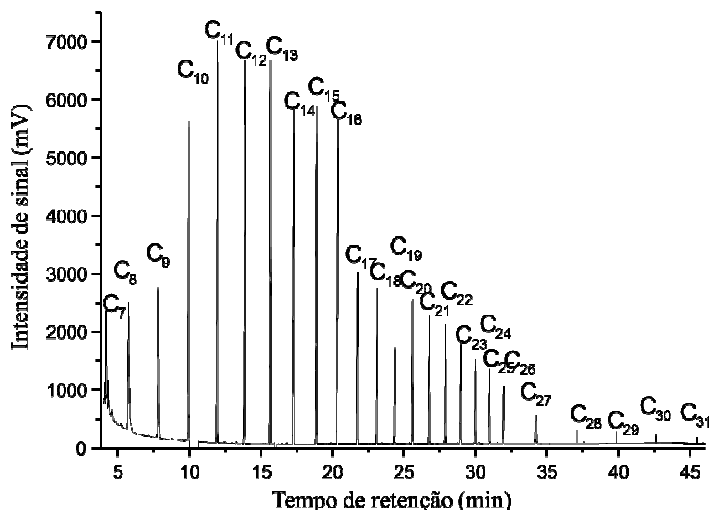


Figura 3- Cromatograma da mistura padrão de alcanos lineares de C₇-C₃₁ analisados por CG-DIC.

Sendo que para a distinção entre os agregados, foram significativos somente os alcanos lineares C₇ (F = 5,199; P < 0,026), C₂₆ (F = 4,844; P < 0,031) e C₂₇ (F = 4,036; P < 0,049).

As variações obtidas no perfil químico cuticular podem ser devido a vários fatores, pois os compostos identificados na cutícula de um inseto tanto podem variar dependendo do status de fertilidade da fêmea (Cuvillier-Hot et al., 2001; Sledge et al., 2001; Biseau et al., 2004; Bhadra et al., 2007; Mitra et al., 2011; Will et al., 2012;) quanto devido ao ambiente (Liang & Silverman, 2000; Silverman & Liang, 2001; Sorvari et al., 2008; Zweden et al., 2009).

Pelo teste estatístico MANOVA em relação a fecundação (Tabela 3), o FTIR-PAS não apresentou nenhum pico individualmente significativo para separar fêmeas fecundadas e não fecundadas e por CG-DIC os alcanos lineares significativos para diferenciar fêmeas fecundadas e não fecundadas foram C₉, C₁₂, C₁₇, C₂₃, C₂₈ e C₃₁ (Tabela 4).

Tabela 4- Dados de F e P para os alcanos lineares de C₇-C₃₁ obtidos por CG-DIC empregando as áreas percentuais relativas de dois agregados de *P. versicolor*

Alcano	Média da área percentual relativa	Agregados		EDO		Espermateca	
		F	P <	F	P <	F	P <
C ₇ H ₁₆	0,315	5,199	0,026	0,180	0,673	0,190	0,664
C ₈ H ₁₈	12,068	0,021	0,884	0,553	0,460	1,152	0,220
C ₉ H ₂₀	0,399	0,258	0,613	0,849	0,360	30,967	0,000
C ₁₀ H ₂₂	0,596	0,131	0,719	1,631	0,206	2,608	0,111
C ₁₁ H ₂₄	0,415	0,213	0,646	0,371	0,545	3,622	0,062
C ₁₂ H ₂₆	0,704	0,090	0,765	0,018	0,895	5,032	0,028
C ₁₃ H ₂₈	0,532	0,066	0,798	0,112	0,739	0,364	0,548
C ₁₄ H ₃₀	0,406	2,543	0,116	0,215	0,645	3,067	0,085
C ₁₅ H ₃₂	0,556	0,078	0,781	0,282	0,597	1,095	0,299
C ₁₆ H ₃₄	1,238	0,084	0,773	0,617	0,435	0,079	0,780
C ₁₇ H ₃₆	0,754	0,063	0,802	0,054	0,817	4,702	0,034
C ₁₈ H ₃₈	0,639	2,589	0,113	2,741	0,103	0,366	0,548
C ₁₉ H ₄₀	0,716	2,765	0,101	1,137	0,290	2,558	0,115
C ₂₀ H ₄₂	0,343	0,019	0,890	0,679	0,413	1,796	0,185
C ₂₁ H ₄₄	1,828	0,422	0,518	3,348	0,072	1,413	0,239
C ₂₂ H ₄₆	3,201	0,533	0,468	0,254	0,616	1,132	0,193
C ₂₃ H ₄₈	1,286	3,591	0,063	3,259	0,076	7,704	0,007
C ₂₄ H ₅₀	2,386	1,481	0,228	0,016	0,901	0,004	0,949
C ₂₅ H ₅₂	2,188	0,047	0,829	0,781	0,380	0,467	0,497
C ₂₆ H ₅₄	2,238	4,844	0,031	0,000	0,987	0,155	0,695
C ₂₇ H ₅₆	2,080	4,036	0,049	0,350	0,556	0,522	0,472
C ₂₈ H ₅₈	2,317	1,946	0,168	0,351	0,556	6,553	0,013
C ₂₉ H ₆₀	4,604	1,825	0,181	0,014	0,907	0,392	0,534
C ₃₀ H ₆₂	3,294	1,040	0,312	0,137	0,713	0,151	0,698
C ₃₁ H ₆₄	2,289	0,003	0,957	0,106	0,746	4,369	0,041

Na Figura 4 tem-se a distribuição das respostas para as espermatecas das fêmeas fecundadas e não fecundadas dos agregados. Sendo a Figura 4A (Wilks's Lambda = 0,097; F = 47,029 e P < 0,000), referente aos alcanos lineares analisados por CG-DIC, com o primeiro eixo explicando 76% e junto com o segundo eixo explicam 100% dos dados. A Figura 4B (Wilks's Lambda = 0,208; F = 25,478 e P < 0,000) é referente aos dados obtidos por FTIR-PAS, com o primeiro eixo explicando 94% e junto com o segundo eixo explicam 100% dos dados.

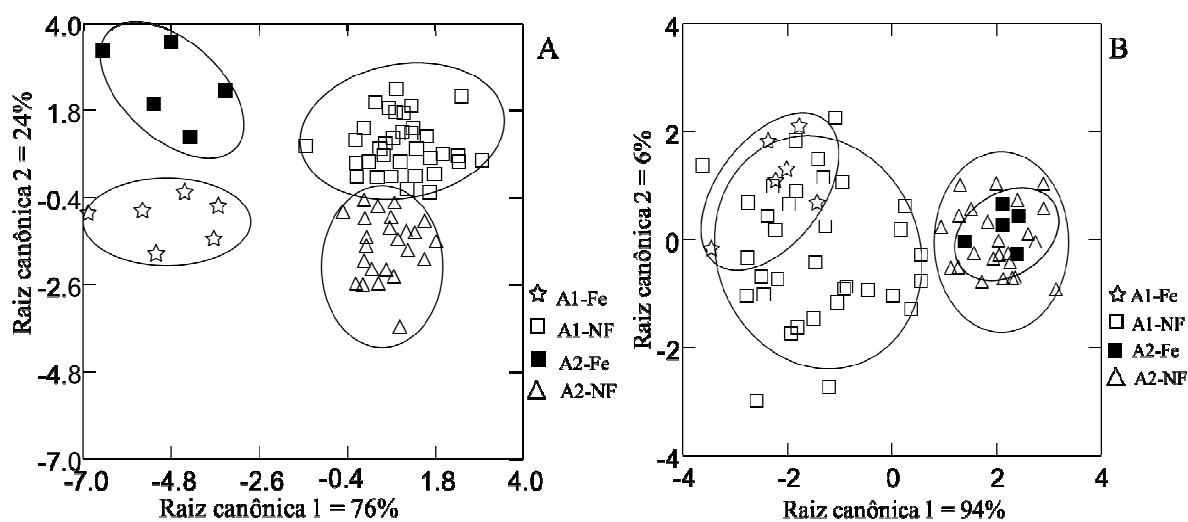


Figura 4-Análise discriminante clássica da espermateca analisados por CG-DIC (A) e por FTIR-PAS (B) de dois agregados de *P. versicolor*

Analisando os dados obtidos por CG-DIC (Figura 4A) e FTIR-PAS (Figura 4B) em relação à fecundação, foi possível separar tanto as fêmeas fecundadas quanto as não fecundadas em quatro blocos distintos por CG-DIC. Enquanto que por FTIR-PAS a separação ocorreu por indivíduos pertencentes ao mesmo agregado, não distinguindo as fêmeas fecundadas das não fecundadas de um mesmo agregado. Essas diferenças mostradas na Figura 4 podem ser atribuídas a diferentes compostos que foram analisados pelas duas técnicas, enquanto que por CG-DIC analisou-se somente alcanos lineares, por FTIR-PAS foram analisadas frequências que podem pertencer a várias outras classes de compostos.

Biseau et al. (2004) analisaram a cutícula de formigas *Linepithema humile*, e constataram que os perfis químicos de fêmeas fecundadas e não fecundadas são diferentes, sendo que as fêmeas fecundadas apresentaram alguns alcanos ramificados como o 5-metilhentriacontano, 5-metildotriacontano, 5-metiltritriacontano e o 5-metiltetratriacontano que não foram observados nas fêmeas não fecundadas. Em relação a alcanos lineares, o C₃₅ e C₃₇ foram abundantes em

fêmeas que ainda não acasalaram e diminuíram quantitativamente em fêmeas fecundadas. Do mesmo modo, Will et al. (2012) analisaram formigas *Cardiocondyla obscurior*, fecundadas e não fecundadas e estas apresentaram uma diferença quantitativa nos alcanos lineares, C₂₅, C₂₇, C₂₈ e C₂₉, sendo que os compostos 3-metilpentacosano, 3-metilheptacosano, 5-metilheptacosano, 11-/13-metilheptacosano e 12-/14-metilheptacosano estavam correlacionados aos perfis químicos cuticulares das fêmeas fecundadas.

Cuvillier-Hot et al. (2004), com base nos perfis químicos cuticulares de formigas *Streblognathus peetersi* mostraram que estes diferem quantitativamente entre alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos entre fêmeas poedeiras, não poedeiras e inférteis. Fêmeas fecundadas da formiga *Crematogaster smithi* foram caracterizadas principalmente pela maior proporção do alcano linear C₃₁ que em fêmeas não fecundadas (Oettle et al., 2008).

Para Oppelt & Heinze (2009) em estudo com formigas *Leptothorax gredleri*, apontaram diferenças nas proporções de compostos cuticulares entre fêmeas virgens, fêmeas recém-fecundadas e após trinta minutos da fecundação, sendo que os compostos importantes para esta distinção foram C₂₄, C₂₆, C₂₇ e C₂₉ que aumentaram e a diminuição de alcanos ramificados após fecundação.

Da mesma forma Nunes et al. (2009) encontraram diferenças entre os compostos cuticulares de rainhas virgens e rainhas fisogástricas da abelha *Schwarziana quadripunctata*, onde estas últimas apresentaram vestígios de compostos com baixa massa molecular e maiores quantidades de hidrocarbonetos insaturados em detrimento de rainhas virgens. Foram identificados ainda, diferenças nos perfis cuticulares de fêmeas reprodutoras e demais fêmeas de formigas *Platythyrea punctata*, caracterizadas quantitativamente, principalmente por alcanos ramificados (Hartmann et al., 2005).

Neste estudo, também foram analisados os níveis de desenvolvimento ovariano das fêmeas dos dois agregados, onde foram identificadas fêmeas pertencentes a três níveis de desenvolvimento ovariano (Tabela 1).

Em estudo realizado por Gobbi et al. (2006) em agregados de *P. versicolor*, foram analisadas fêmeas com até quatro graus de desenvolvimento ovariano e estas apresentaram fêmeas fecundadas em menor quantidade do que em colônias de mesma espécie.

Analisando os estágios de desenvolvimento ovariano das fêmeas, dos quinze picos somente cinco destes, os picos 4 (2923 cm^{-1}), 5 (2854 cm^{-1}), 8 (1542 cm^{-1}), 10 (1380 cm^{-1}) e 11 (1241 cm^{-1}) não foram significativos para diferenciar os grupos.

Em relação aos alcanos lineares analisados por CG-DIC, não houve nenhum n-alceno isoladamente significativo para distinguir as fêmeas dos diferentes estágios de desenvolvimento ovariano.

A Figura 5 é relativa à distribuição das fêmeas nos estágios de desenvolvimento ovariano para cada agregado. A Figura 5A (Wilks's Lambda = 0,072; F = 49,027 e P < 0,000), com a primeira raiz canônica explicando 72%, juntamente com a segunda explicam 100%. Figura 5C (Wilks's Lambda = 0,328; F = 9,313 e P < 0,000), com a primeira raiz canônica explicando 84% dos dados, as duas explicando 100%, para os dados analisados por CG-DIC.

As Figuras 5B (Wilks's Lambda = 0,156; F = 27,503 e P < 0,000; a primeira raiz canônica explicando 69%, juntamente com a segunda raiz canônica explicam 100%) e 5D (Wilks's Lambda = 0,115; F = 24,404 e P < 0,000) com a primeira raiz canônica explicando 61%, juntamente com a segunda raiz explicam 100% para os dados obtidos por FTIR-PAS referente aos agregados 1 e 2, respectivamente.

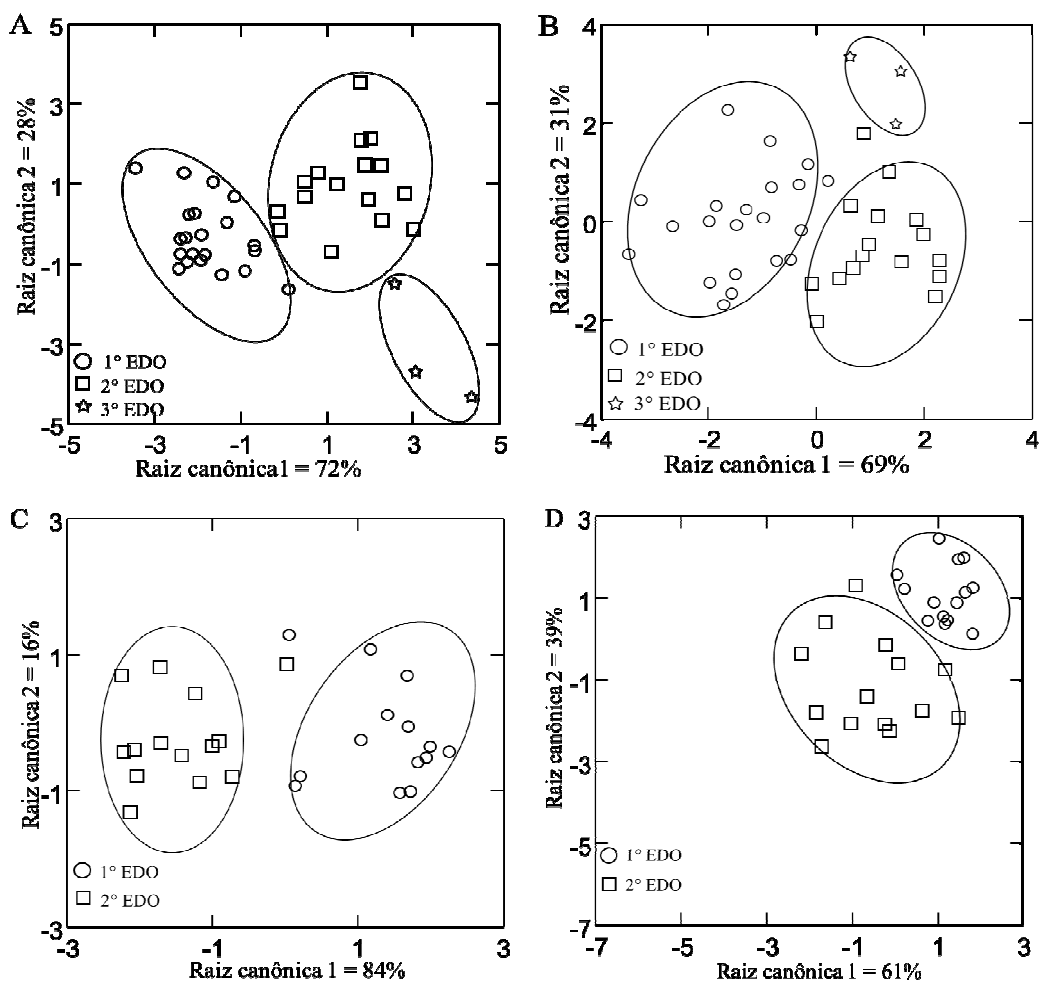


Figura 5 - Análise discriminante clássica dos estágios de desenvolvimento ovariano de dois agregados de *P. versicolor* A) Agregado 1, analisados por CG-DIC; B) Agregado 1, analisados por FTIR-PAS; C) Agregado 2, analisados por CG-DIC e D) Agregado 2, analisados por FTIR-PAS.

Com base na composição química cuticular, foi possível separar das fêmeas de *P. versicolor* pelos níveis de desenvolvimento ovariano (Figura 5).

Sledge et al. (2001) estudando hidrocarbonetos cuticulares de *Polistes dominulus*, verificaram que estes são usados como pistas de reconhecimento dos níveis de desenvolvimento ovariano das fêmeas da colônia. Brunner & Heinze (2009) estudou a formiga *Temnothorax unifasciatus* e relatou que compostos cuticulares são indicativos do estado reprodutivo das fêmeas, sendo que os alcanos lineares que mais contribuíram para a diferenciação foram o C₂₇ e C₂₉. Dapporto et al. (2004) encontraram diferenças qualitativas na composição química cuticular de vespas *P. dominulos* de acordo com seu status reprodutivo, onde fêmeas alfas continham os compostos C₂₉:1 e C₃₁:1 e que estavam ausentes em fêmeas betas. Para Sledge et al. (2004) a atividade ovariana está correlacionada com as diferenças encontradas nos perfis químicos da assinatura cuticular das fêmeas de *P. dominulus*.

Conclusão

Fêmeas oriundas de agregados distintos se diferenciam pela química de sua cutícula em *P. versicolor*. Nos agregados houve uma distinção na composição química cuticular entre fêmeas com diferentes graus de desenvolvimento ovariano tanto por CG-DIC como por FTIR-PAS. Também foi possível diferenciar fêmeas fecundadas de não fecundadas, nestes agregados empregando a técnica de cromatografia gasosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIALLI-JUNIOR, W. F.; LIMA, S. M.; ANDRADE L. H. C.; SUAREZ, Y. R.
Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 492- 499, 2007.
- ANTONIALLI-JUNIOR, W.F.; SÚAREZ, Y.R.; IZIDA, T.; ANDRADE, L.H.C.; LIMA, S.M.
Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 559-566, 2008.
- BAIO, M. V.; NOLL, F. B.; ZUCCHI, R. Morphological caste differences, variation according to colony cycle, and non-sterility of workers in *Brachygastra augusti* (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini), a Neotropical swarm-founding wasp. **Journal of the New York Entomological Society**, v. 111, n.4, p. 243–253, 2004.
- BHADRA, A.; IYER, P. L.; SUMANA, A.; DESHPANDE, S. A.; GHOSH, S.; GADAGKAR, R. How do workers of the primitively eusocial wasp *Ropalidia marginata* detect the presence of their queens? **Journal of Theoretical Biology**, v. 246, n. 3, p. 574–582, 2007.
- BISEAU, J-C.; PASSERA, L.; DALOZE, D.; ARON, S. Ovarian activity correlates with extreme changes in cuticular hydrocarbon profile in the highly polygynous ant, *Linepithema humile*. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 585–593, 2004.
- BONAVITA-COUGOURDAN, A.; THEREULAZ, G.; BAGNÉRES, A.G.; ROUX, M.; PRATTE, M.; PROVOST, E.; CLEMENT, J.L. Cuticular hydrocarbons, social organization and ovarian development in a polistine wasp: *Polistes dominulus* Christ. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 100B, p.667–680, 1991.

- BOS, N.; DREIER, S.; JØRGENSEN, C. G.; NIELSEN, J.; FERNANDO J. GUERRIERI, F. J.; D'ETTORRE, P. Learning and perceptual similarity among cuticular hydrocarbons in ants. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p.138–146, 2012.
- BRUNNER, E.; KROISS, H.; HEINZE, J. Chemical correlates of reproduction and worker policing in a myrmicine ant. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p.19–26, 2009.
- CAPPA, F.; BRUSCHINI, C.; CERVO, R.; TURILLAZZI, S.; BEANI, L. Males do not like the working class: male sexual preference and recognition of functional castes in a primitively eusocial wasp. **Animal Behaviour**, v. 86, p.801-810, 2013.
- COSTANZI, E.; BAGNÈRES, A-G.; LORENZI, M. C. Changes in the hydrocarbon proportions of colony odor and their consequences on nestmate recognition in social wasps. **Plos One**, v. 8, n. 5, 2013.
- COTONESCHI, C.; DANI, F. R.; CERVO, R.; SLEDGE, M. F.; TURILLAZZI, S. *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) larvae possess their own chemical signatures. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p. 954–963, 2007.
- CUVILLIER-HOT, V.; COBB, M.; MALOSSE, C.; PEETERS, C. Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 485–493, 2001.
- CUVILLIER-HOT, V.; LENOIR, A.; CREWE, R.; MALOSSE, C.; PEETERS, C. Fertility signalling and reproductive skew in queenless ants. **Animal Behaviour**, v. 68, p.1209–1219, 2004.
- DANI, F. R.; JONES, G. R.; DESTRI, S.; SPENCER, S. H.; TURILLAZZI, S. Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. **Animal Behaviour**, v. 62, p.165–171, 2001.

- DAPPORTO, L.; SLEDGE, F. M.; TURILLAZZI, S. Dynamics of cuticular chemical profiles of *Polistes dominulus* workers in orphaned nests (Hymenoptera, Vespidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 51, p. 969–973, 2005.
- DAPPORTO, L.; THEODORA, P.; SPACCHINI, C.; PIERACCINI, G.; TURILLAZZI, S. Rank and epicuticular hydrocarbons in different populations of the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera, Vespidae). **Insectes Sociaux**, v. 51, p.279–286, 2004.
- DAPPORTO, L.; LAMBARDI, D.; TURILLAZZI, S. Not only cuticular lipids: First evidence of differences between foundresses and their daughters in polar substances in the paper wasp *Polistes dominulus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p.89–95, 2008.
- DEVIGNE, C. & BISEAU, J-C. The differential response of workers and queens of the ant *Lasius niger* to an environment marked by workers: Ants dislike the unknown. **Behavioural Processes**, n. 91, p. 275– 281, 2012.
- FERREIRA-CALIMAN, M. J.; FALCÓN, T.; MATEUS, S.; ZUCCHI, R.; NASCIMENTO, F. S. Chemical identity of recently emerged workers, males, and queens in the stingless bee *Melipona marginata*. **Apidologie**, v. 44, n. 6, p. 657-665. 2013.
- FORSYTH, A. **Studies on behavioral ecology of polygynous wasps**. 226p. Doctoral dissertation - Harvard University, Cambridge, 1978.
- GOBBI, N.; NOLL, F. B.; PENNA, M. A. H. “Winter” aggregations, colony cycle, and seasonal phenotypic change in the paper wasp *Polistes versicolor* in subtropical Brazil. **Naturwissenschaften**, v. 93, p.487–494, 2006.
- GOBBI, N.; GOVONE, J. S.; PINTO, N. P. O.; PREZOTO, F. Produtividade em colônias de *Polistes (Aphanilopterus) versicolor* Olivier, 1791 (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae). **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 11, n.3, p. 191-199, 2009.

- GOŁEBIOWSKI, M.; CERKOWNIAK, M.; BOGUS, M. I.; WŁÓKA, E.; DAWGUL, M.; KAMYSZ, W.; STEPNOWSKI, P. Free fatty acids in the cuticular and internal lipids of *Calliphora vomitoria* and their antimicrobial activity. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, p. 416–429, 2013.
- GONZALEZ J.A., NASCIMENTO F.S., GAYUBO S.F. Observations on the winter aggregations of two polistine paper wasps (Hymenoptera Vespidae Polistinae). **Tropical Zoology**, v. 15, p.1–4. 2002.
- GOODPASTER, A. M.; & KENNEDY, M. A. Quantification and statistical significance analysis of group separation in NMR-based metabonomics studies. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 109, p.162–170, 2011.
- GULLAN, P. J. & CRANSTON, P. S. **The Insects: an outline of entomology**. Hoboken, New Jersey: WILEY-BLACKWELL, 2010. 565p.
- HANNONEN, M.; SLEDGE, M. F.; TURILLAZZI, S.; SUNDSTRÖM, L. Queen reproduction, chemical signalling and worker behaviour in polygyne colonies of the ant *Formica fusca*. **Animal Behaviour**, v. 64, n. 3, p. 477–485, 2002.
- HARTMANN, A.; D’ETTORRE, P.; JONES, G. R.; HEINZE, J. Fertility signaling- the proximate mechanism of worker policing in a clonal ant. **Naturwissenschaften**, v. 92, p. 282–286, 2005.
- HOWARD, R. W. & BAKER, J. E. Stage-specific surface chemicals of *Plodia interpunctella*: 2-acyl-1,3-cyclohexanediones from larval mandibular glands serve as cuticular lipids. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 138:B, p.193–206, 2004.

- JEANNE, R. L. The swarm-founding Polistinae. In K.G. ROSS & R.W. MATTHEWS (editors). **The social biology of wasps**. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1991, p. 191–231.
- LIANG, D. & SILVERMAN, J. “You are what you eat”: Diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. **Naturwissenschaften**, v. 87, p. 412–416, 2000.
- LOCKEY, K. H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparative Biochemistry and Physiology - Parte B**, v. 89, p. 595-645, 1988.
- LORENZI, M. C.; SLEDGE, M. F.; LAIOLO, P.; STURLINI, E.; TURILLAZZI, S. Cuticular hydrocarbon dynamics in young adult *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) and the role of linear hydrocarbons in nestmate recognition systems. **Journal of Insect Physiology**, V. 50, P. 935–941, 2004.
- LORENZI, M. C.; CERVO, R.; BAGNÈRES, A-G. Facultative social parasites mark host nests with branched hydrocarbons. **Animal Behaviour**, v. 82, p.1143-1149, 2011.
- MITRA, A.; SAHA, P.; CHAOULIDEER, M. E.; BHADRA, A.; GADAGKAR, R. Chemical communication in *Ropalidia marginata*: Dufour’s gland contains queen signal that is perceived across colonies and does not contain colony signal. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 280–284, 2011.
- NAGAMATI JUNIOR, K.; SIMOKOMAKI, K.; GRUBER, C. V.; DEL LAMA, M. A. Sociogenetic structure of *Polistes* (*Aphanilopterus*) *versicolor* Olivier, 1791 colonies (Hymenoptera, Vespidae, Polistini). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n.4, p.669-675, 2010.
- NEVES, E. F.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R.; LIMA, S. M.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F. Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus*

- consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 1891-1898 2012.
- NODA, S. C. M.; SHIMA, S. N.; NOLL, F. B. Morphological and physiological caste differences in *Synoeca cyanea* (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini) according to the ontogenetic development of the colonies. **Sociobiology**, v.41, p.547-570, 2003.
- NUNES, T. M.; TURATTI, I. C. C.; MATEUS, S.; NASCIMENTO, F. S.; LOPES, N.P.; ZUCCHI, R. Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 589-595, 2009.
- OETTLER, J.; SCHMITT, T.; HERZNER, G.; HEINZE, J. Chemical profiles of mated and virgin queens, egg-laying intermorphs and workers of the ant *Crematogaster smithi*. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p. 672–679, 2008.
- OLIVEIRA, O. A.L.; NOLL, F. B. 1; MATEUS, S.; GOMES, B. Castes and Asynchronous Colony Cycle in *Polybia bistriata* (Fabricius) (Hymenoptera: Vespidae). **Neotropical Entomology**, v. 36, n.6, p.817-827, 2007.
- OLIVEIRA, P. S. & HÖLLDOBLER, B. Dominance orders in the ponerine ant *Pachicondila apicalis* (Hymenoptera: Formicidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**. v. 27, p. 385-393, 1990.
- OLANIRAN, O. A.; SUDHAKAR, A. V. S.; DRIJFHOUT, F. P.; DUBLON, I. A. N.; HALL, D. R.; HAMILTON, J. G. C.; KIRK, W. D. J. A male-predominant cuticular hydrocarbon, 7-methyltricosane, is used as a contact pheromone in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. **Journal of Chemical Ecology**, v.39, p.559–568, 2013.

- OPPELT, A. & HEINZE, J. Mating is associated with immediate changes of the hydrocarbon profile of *Leptothorax gredleri* ant queens. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 624–628, 2009.
- PARDI, L. Dominance order in *Polistes* wasps. **Physiological Zoology**, v.21, p.1-13, 1948.
- PAIVA, M. R.; PEDROSA-MACEDO, J. H. **Feromonas de Insetos**. Curitiba: GTZ, 1985. 84 p.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução a espectroscopia**. São Paulo: Cengage, 2010. 716 p.
- RICHARDS, O. W. The biology of the social wasps (Hymenoptera, Vespidae). **Biological Reviews**, v. 46, p. 483-528, 1971.
- ROSS, K.G. & MATTHEWS, R.W. (editors), **The social biology of wasps**. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1991.
- SILVERSTEIN, R. M. & WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC. 2000. 460p.
- SILVERMAN, J. & LIANG, D. Colony disassociation following diet partitioning in a unicolonial ant. **Naturwissenschaften**, v.88, p.73–77, 2001.
- SLEDGE, M. F.; BOSCARO, F.; TURILLAZZI, S. Cuticular hydrocarbons and reproductive status in the social wasp *Polistes dominulus*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 49, n.5, p. 401-409, 2001.
- SLEDGE, M.F.; TRINCA, I.; MASSOLO, A.; BOSCARO, F.; TURILLAZZI, S. Variation in cuticular hydrocarbon signatures, hormonal correlates and establishment of reproductive dominance in a polistine wasp. **Journal of Insect Physiology**, v.50 p. 73–83, 2004.
- SORVARI, J.; THEODORA, P.; TURILLAZZI, S.; HAKKARAINEN, H.; SUNDSTROM, L. Food resources, chemical signaling, and nestmate recognition in the ant *Formica aquilonia*. **Behavioral Ecology**, v.19, p.441–447,2008.

- TANNURE, I. C. & NASCIMENTO, F. S. Influência do conflito de dominância entre fundadoras em colônias de vespas sociais pertencentes ao gênero *Polistes* (HYMENOPTERA: VESPIDAE). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 1, n.1, p. 31-40, 1999.
- TRIOLA, Mario F. **Introdução à estatística**. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 452 p.
- VIEIRA, E. O.; PRATES, H. T.; PEREIRA, J.R. B.; SILVA, G. F.; DUARTE, F. V.; NERES, P. M. Avaliação da contaminação do carbofuran nos solos do Distrito de Irrigação do Gorutuba. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.3, p.250–256, 2009.
- VILELA, E. F. & DELLA LÚCIA, T. M. C. **Feromônios de insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1987. 155 p.
- ZARBIN, P.H. G. & RODRIGUES, M. A. C. M. Feromônios de insetos: Tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.722-731, 2009.
- ZWEDEN, J. S. V.; DREIER, S.; D'ETTORRE, P. Disentangling environmental and heritable nestmate recognition cues in a carpenter ant. **Journal of Insect Physiology**, v.55, p.158–163, 2009.
- WEST-EBERHARD M.J. The social biology of polistine wasps. **Miscellaneous Publications Museum of Zoology**, University of Michigan v.140, p.1-101, 1969.
- WEST-EBERHARD, M. J. Monogyny in *polygynous* social wasps. **Proceedings of the VII Congress of I.U.S.S.I.** London, 1973, 396–403p.
- WILL, S.; DELABIE, J. H.C.; HEINZE, J.; RUTHER, J.; OETTLER, J. Cuticular lipid profiles of fertile and non-fertile *Cardiocondyla* ant queens. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p.1245–1249, 2012.