

**INFLUÊNCIA DE FATORES EXÓGENOS SOBRE A
COMPOSIÇÃO QUÍMICA CUTICULAR E DO VENENO DE
Ectatomma brunneum SMITH 1858 (HYMENOPTERA,
FORMICIDAE) UTILIZANDO COMO METODOLOGIA A
TÉCNICA DE FTIR-PAS**

Rafaella Caroline Bernardi

DOURADOS-MS
2014

**INFLUÊNCIA DE FATORES EXÓGENOS SOBRE A
COMPOSIÇÃO QUÍMICA CUTICULAR E DO VENENO DE
Ectatomma brunneum SMITH 1858 (HYMENOPTERA,
FORMICIDAE) UTILIZANDO COMO METODOLOGIA A
TÉCNICA DE FTIR-PAS**

Acadêmica: Rafaella Caroline Bernardi
Orientador: Prof. Dr. Sandro Marcio Lima
Coorientador: Prof. Dr. William Fernando Antonialli Jr

“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.”

B444 Bernardi, Rafaella Caroline

Influência de fatores exógenos sobre a composição química cuticular e do veneno *Ectatomma brunneum* Smith 1858/Rafaella Caroline Bernardi. Dourados, MS: UEMS, 2014.

80p. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Recursos Naturais – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Marcio Lima.

1. Química cuticular 2. Veneno 3. *Ectatomma brunneum* I.
Título.

CDD 20.ed. 541

*"Aprendi que a coragem não é a
ausência do medo, mas o triunfo sobre
ele. Senti medo mais vezes do que
consigo recordar, mas escondi-o atrás
de uma máscara de ousadia. O homem
de coragem não é o que não sente medo,
mas aquele que o vence."*

*Nelson Mandela
(1918-2013)*

Ao meu amado avô Severino Bernardi, exemplo de dedicação e luta
pela educação de sua família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo aos meus pais, pela dedicação, amor, paciência e por sempre me manterem no caminho do conhecimento.

Ao meu irmão, meu maior exemplo de vitória, obrigada por sempre estar ao meu lado acreditando no meu potencial.

Ao meu marido, meu grande amor, que apesar dos tropeços da vida me faz querer sempre ir além e ser melhor. Desculpe-me pela ausência. Eu te amo.

A meus tios, Nereu, Lucrecia e Lucila, por todo apoio e por sempre fazerem eu me sentir especial.

Obrigada minha família por todos vocês nunca deixarem de acreditar em mim, amo vocês.

Agradeço aos meus amigos que me acompanham desde as aventuras da graduação, Pamela, Ingrid, Dinorah, Lucimara e Paula. Em especial, agradeço a minha grande amiga Cristiane, minha guia nos programas de computador e em possíveis esquecimentos e, ao meu amigo Márlon, que me emprestou além do seu conhecimento, sua força.

Aos meus novos amigos e colegas de laboratório do GEOF, que tive o prazer de trabalhar e conviver nesses dois últimos anos, Francylaine, Maryleide, Alex, Márcio, Fábio, Milleny, Rodrigo, Ana Kely, Ana Paula, Claudio, Rogério, Junior e Warley. Em especial Larissa, Thaís e Thayne, que além do trabalho, estiveram ao meu lado em todos os momentos que precisei.

Em especial, quero agradecer a minha amiga e colega de trabalho Ellen, sem você esses dois anos teriam sido muito mais difíceis. Obrigada pelo apoio, por dividir seu conhecimento e por sempre estar disposta a trabalhar mais.

Aos meus amigos do laboratório de Ecologia, Denise, Angélica, Kamylla, Viviane, Dayana, Luan, Maria, Erika, Eva, Luiz, Mychelly, Juliana, Romário e Thiago, além de outros que já mencionei.

A todos os meus colegas de mestrado, em especial minha amiga Jane.

Ao seu Vitor, sempre disposto a colaborar nos trabalhos de campo.

A secretária do programa, Michele Beloto, por sempre estar disposta a nos ajudar.

Aos professores e alunos da Universidade Estadual de Santa Cruz, pela ajuda e por me envolverem ainda mais na paixão pelo veneno de formiga.

Aos professores Luis Andrade, Yzel Suárez e Claudia Cardoso, pela paciência, exemplo e colaboração em todas as fases deste trabalho. Em especial quero agradecer imensamente aos professores Sandro Lima e William Antonialli, que sem dúvidas foram os professores que mais deixaram marcas na profissional que estou me tornando.

À UEMS, todos os meus professores da Graduação em Ciências Biológicas e do Programa de Mestrado em Recursos Naturais.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Enfim, a todas as pessoas que me ajudaram a enfrentar mais esse obstáculo importante em minha vida, onde fui em busca de conhecimento.

Obrigada por tudo.

SUMÁRIO

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Capítulo 1 – Apresentação.....	3
Capítulo 2 – Introdução.....	5
2.1 Ordem Hymenoptera.....	5
2.2 Família Formicidae.....	5
2.3 Sistema de Comunicação Químico e suas variações.....	7
2.3.1 Química Cuticular.....	7
2.4 Sistema Venenífero e suas variações.....	8
2.4.1 Veneno.....	9
2.5 Espécie <i>Ectatomma brunneum</i>	11
2.6 Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier	12
2.7 Objetivo.....	15
Referência.....	15
Capítulo 3 – Materiais e Métodos.....	23
3.1 Coleta, manutenção e preparo dos exemplares de <i>E. brunneum</i> para análise...	23
3.1.1 Estudo do efeito da dieta sobre os compostos químicos cuticulares....	23
3.1.2. Estudo da influência ambiental sobre o veneno de <i>E. brunneum</i> através da técnica de FTIR-PAS.....	27

3.2 Técnicas utilizadas para leitura das amostras.....	28
3.2.1 Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier.....	28
3.2.2 Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama(CG-DIC). 29	
3.2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)...	30
3.3 Análise estatística.....	30
Referências.....	31
Capítulo 4 – The Role of Diet in the Cuticular Chemical Composition of <i>Ectatomma brunneum</i> : Ftir-Pas as a Potential Tool.....	33
Referência.....	51
Capítulo 5 – Variação Intraespecífica da Composição Química do Veneno da Formiga <i>Ectatomma brunneum</i> (Formicidae: Ectatomminae) Analisados pela Técnica de FTIR-PAS.....	58
Referência.....	72
Capítulo 6 – Considerações Finais.....	80

RESUMO

Os insetos sociais, em particular as formigas, desenvolveram ao longo de sua evolução um sistema eficiente de sinais químicos que são à base de sua estrutura social. O reconhecimento e discriminação entre companheiras de ninho se tornou, indiscutivelmente, uma das forças seletivas na evolução da sociedade nos insetos. Ademais, o singular domínio dos insetos e de outros artrópodes terrestres pode ser atribuído, em parte, a grande diversidade de mecanismos de defesa químicos presentes em seus corpos, entre eles, está a glândula de veneno. Os Hidrocarbonetos Cuticulares (HCs) são os principais autores no reconhecimento de companheiras de ninho, funcionando como uma assinatura química da colônia. Por outro lado, a glândula de veneno representa um dos principais sistemas de defesa em formigas. O método mais usual para leitura destes compostos químicos é a Cromatografia. Porém, recentemente a Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS) tem mostrado muito boa eficiência para estudos de ligações químicas de diferentes sistemas biológicos, entre eles os insetos sociais. Uma vez que já foram documentados em outros trabalhos que tanto compostos químicos cuticulares quanto o veneno de insetos sociais são influenciados, em parte, por fatores exógenos, sobretudo a dieta, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de fatores exógenos sob a variação intraespecífica da composição química cuticular e do veneno da formiga *Ectatomma brunneum*. Também pretendeu-se avaliar a confiabilidade da técnica FTIR-PAS comparando seus resultados com os obtidos pela Cromatografia Gasosa com detector de ionização em chama. Os resultados indicam que as informações hereditárias não são as únicas responsáveis por descrever a assinatura química e o veneno de uma espécie, sendo que as variações ambientais também se unem para formar os aparatos químicos de formigas. Os resultados reforçam a alta eficiência da FTIR-PAS como ferramenta de análise de sistemas biológicos.

ABSTRACT

Social insects, particularly the ants, evolved from an efficient system of chemical signs, which are the major responsible in the social structure of a colony. Recognition and discrimination among nestmates became, undoubtedly, one of the selective forces in the society evolution in insects. Moreover, the singular domain of insects and other terrestrial arthropods may be attributed, in part, to the great diversity of chemical defense mechanisms present in their bodies, among them, is the venom gland. Cuticular hydrocarbons (CHs) are the main authors in the recognition of nestmates, working as a chemical signature of the colony. On the other hand, the venom gland represents one of the main defense systems in ants. The most usual method for reading these chemical compounds is the chromatography. Recently however, the Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy (FTIR-PAS) has shown very good efficiency in studies of chemical bonds from different biological systems, among them, social insects. Since it was already reported in other papers that both the cuticular chemical compounds and the venom of social insects are influenced, in part, by exogenous factors, mainly the diet, the goal of this paper was to evaluate the effect of exogenous factors under the intraspecific variation of cuticular chemical compound and the venom of the ant *Ectatomma brunneum*. The reliability of the FTIR-PAS technique was also assessed by comparing its results to those obtained by gas chromatography with flaming ionization detection. Results show that hereditary informations are not the only responsible to describe the chemical signature and venom of a specie, and that environment variations also join to form the chemical apparatus of ants. Results reinforce the high efficiency of FTIR-PAS as an analyses tool of biological system.

CAPÍTULO 1. APRESENTAÇÃO

O presente trabalho teve como intuito explorar a espécie de formiga *Ectatomma brunneum* quanto à interferência dos fatores exógeno sobre o perfil químico dos Hidrocarbonetos Cuticulares (HCs) e do veneno, utilizando como metodologia a técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS, *Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy*).

Na primeira parte do trabalho, quatro colônias de *E. brunneum* foram coletadas e alocadas em ninhos artificiais no laboratório para controle dos fatores ambientais, sobretudo da dieta, sobre a assinatura química dos HCs. Exemplares das quatro colônias foram separados, sacrificados e armazenados no dia da coleta, para comparação com os indivíduos que permaneceriam em laboratório. Para este estudo, além da observação das possíveis alterações do HCs influenciadas pelo ambiente, também foi destacado, por meio de comparação com os resultados analisados por Cromatografia Gasosa (método mais usual para o estudo de composição de HCs), a eficiência da técnica de FTIR-PAS para esse tipo de análise.

Em sequência, a influência dos fatores exógenos sobre o veneno de *E. brunneum*, foi estudada a partir da análise química do veneno de populações de quatro regiões com diferenças ambientais. As análises desta etapa foram feitas pela técnica de FTIR-PAS combinada com análise estatística dos dados de absorção óptica no infravermelho médio. Este estudo com veneno representa a primeira investida do Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (GEOF) da UEMS no estudo da composição de peçonha

Ambos os estudos desenvolvidos, além dos resultados finais, exploraram a descrição das melhores metodologias para a pesquisa com esses tipos de amostras. Os testes para realização dos experimentos, principalmente com o veneno, envolveram a melhor forma de extração da peçonha, quantidade desta amostra para cada leitura, assim como, a melhor resolução, número de varreduras, velocidade de leitura e estudo dos melhores métodos estatísticos para cada um dos experimentos. Os resultados, portanto, contribuíram não somente com os dados sobre a influência exógena sobre os HCs e

veneno, mas também com trabalhos futuros a serem explorados com este tema e avaliados, principalmente, com a técnica de FTIR-PAS.

Este estudo foi motivado pela premente necessidade de se compreender as influências exógenas sobre alguns elementos químicos presentes nas formigas, dando destaque a peçonha, onde os estudos podem contribuir para a resposta de soros anti-veneno e para a produção de fármacos, além de descrever melhor a espécie *E. brunneum*. Objetivou-se também, relacionar uma técnica mais usual com um método não tão comum para este tipo de material, a fim de somar a este campo, uma técnica eficiente que proporcione reprodutibilidade e rapidez de resultados, quando comparadas a outras metodologias.

A apresentação do trabalho seguirá com os capítulos: Introdução, onde constará uma revisão bibliográfica do tema, abordando a Ordem Hymenoptera, Família Formicidae, sistemas de comunicação e defesa, FTIR-PAS, e objetivos; Materiais e Métodos, descrevendo a captura e preparo de amostras e as técnicas de FTIR-PAS, Cromatografia Gasosa e análise estatística; a parte de resultados e discussão ficou separada em dois artigos, sendo que um explora a influência da dieta sobre os HCs da espécie e a eficiência da técnica de FTIR-PAS para essa análise; e o outro artigo explora a influência da variação ambiental sobre o veneno de diferentes populações de *E. brunneum*; finalmente um capítulo com as considerações finais, apresentando os resultados dos estudos e perspectivas futuras. Sendo assim, seguem-se as etapas desta dissertação de mestrado, como um dos requisitos para obtenção do título de mestre em Recursos Naturais.

CAPÍTULO 2. INTRODUÇÃO

2.1 ORDEM HYMENOPTERA

Os insetos da ordem Hymenoptera, correspondentes às vespas, abelhas e formigas, são uma das formas de vida dominante no planeta, levando em consideração o número de espécies e diversidade de comportamentos. Os himenópteros são representados, principalmente, por espécies solitárias dentro de sua gama de diferentes exemplares, podendo ser parasitoides, predadores e herbívoros, mas algumas espécies do grupo podem apresentar o perfil de organização social, tendo as formigas como o principal destaque dentro desta variação de comportamento (AUSTIN & DOWTON, 2000). Os primeiros registros fósseis de Hymenoptera apareceram no final do Triássico, cerca de 230 milhões de anos atrás, sendo que as primeiras espécies, provavelmente, eram herbívoras. O modo de vida parasitoide e aqueles que desenvolveram ferrão, não apareceram até cerca de 210 e 155 milhões de anos atrás (GRIMALDI & ENGEL, 2005), sendo que o ferrão se desenvolveu a partir de uma modificação do aparelho ovopositor dentro desta ordem (MACLINTAL & STARR, 1996).

Os Himenoptera, então, se diversificaram em uma variedade de formas morfológicas e modos de vida e, em termos de diversidade e abundância, é uma das maiores ordens de insetos do planeta (GASTON, 1993; AUSTIN & DOWTON, 2000), atrás de Coleóptera e Lepidóptera (STORK, 1997).

2.2 FAMÍLIA FORMICIDAE

As formigas estão dentro de uma única família, a Formicidae (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990), que engloba vinte e cinco subfamílias conhecidas, quatro delas extintas, sendo que quatorze, das que permanecem, são encontradas no Brasil. Já foram descritas, até o momento, aproximadamente 11.500 espécies em todo o mundo (FERNÁNDEZ &

SENDOYA, 2004), mas estima-se que existam entre 18.000 e 20.000 espécies (BROWN JUNIOR, 2000).

As formigas estão presentes em todos os biomas terrestres, sobretudo na região tropical, com exceção dos polos. Elas são dominantes na maioria dos ecossistemas terrestres, ocupando uma faixa territorial que vai da linha do Equador a latitudes de aproximadamente cinquenta graus e, em termos de altitude, podem ser encontradas do nível do mar até 3.000 metros (BRANDÃO, 1999).

As formigas são insetos holometabólicos, ou seja, com metamorfose completa, (CAMPOS-FARINHA *et al.*, 1997) , eusociais, caracterizadas pela sobreposição de gerações, cuidado cooperativo com a prole , divisão de trabalho entre castas, incluído o estado reprodutivo (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). A família é reconhecida por possuir pecíolo, antenas do tipo geniculadas e glândula metapleurálica, que é uma sinapomorfia do grupo (FERNÁNDEZ & PALACIO, 2003).

Este grupo apresenta hábitos alimentares muito diversos, o que contribuiu com o sucesso desde representantes que se alimentam de fungos (GONÇALVES, 1945), exsudatos de nectários florais e extraflorais (DELABIE *et al.*, 2003), “*honeydew*” de pulgões, cochonilhas e cigarrinhas (DELABIE & FERNÁNDEZ, 2003), sementes (GORDON, 2002), além de outros grupos que são predadores, ou onívoros (FOWLER *et al.*, 1991). Nas formigas, os açúcares são usados principalmente como uma fonte de energia para operárias adultas, sendo que a proteína é destinada, prioritariamente, para formação de ovos e crescimento de larvas (BRIAN, 1983). Uma outra característica biológica que explica o sucesso ecológico das formigas é a sua grande capacidade em modificar ou explorar seu ambiente para nidificar, sendo que seus ninhos podem ser arbóreos , superficiais ou subterrâneos (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

As formigas podem ser comparadas a uma fábrica de materiais químicos, já que elas apresentam distribuídas por todo o corpo, um sistema de mais de cinquenta glândulas exócrinas diferentes (BILLEN, 2004). Portanto, devido a sua abundância, facilidade de manutenção das colônias em laboratório e a variedade de comportamentos, as formigas se tornaram o principal sistema biológico para o estudo dos aparatos químicos entre os insetos sociais (MARTIM & DRYFHOUT, 2009).

2.3 SISTEMA DE COMUNICAÇÃO QUÍMICO E SUAS VARIAÇÕES.

Os insetos sociais, em particular as formigas, desenvolveram ao longo de sua evolução um sistema eficiente de sinais químicos que são à base de sua estrutura social, permitindo o reconhecimento e comunicação entre os indivíduos da colônia. O reconhecimento e discriminação entre companheiras de ninho se tornou, indiscutivelmente, uma das forças seletivas na evolução da sociedade destes insetos (LENOIR *et al.*, 1999), sendo que a estrutura genética para produção destes sinais já estava presente nas formigas ancestrais, permanecendo nas radiações posteriores (LIÉNARD *et al.*, 2008).

Atualmente são conhecidas 12 categorias funcionais de comunicação, a maioria de natureza química (HOLLDOBER & WILSON, 1990). Entre estas, a composição química cuticular, destacando-se os Hidrocarbonetos Cuticulares (HCs), também chamados de feromônios superficiais, são os principais responsáveis pela codificação dos sinais químicos de reconhecimento em insetos sociais, principalmente em formigas (LAHAV *et al.*, 1999; LENOIR *et al.*, 1999).

2.3.1 QUÍMICA CUTICULAR

A química cuticular, além da função primária de proteção contra microorganismos, toxinas e dessecação (LENOIR *et al.*, 2001), têm papel determinante no reconhecimento inter e intraespecífico e até na diferenciação de castas (LENOIR *et al.*, 1999; ANTONIALLI JR *et al.*, 2007; ANTONIALLI JUNIOR *et al.*, 2008)

Dentro de uma mesma espécie de insetos sociais, o perfil qualitativo da cutícula é praticamente os mesmos, variando apenas nas suas proporções relativas conforme a origem de sua colônia (BONAVITA- COUGOURDA *et al.*, 1987). Estes compostos funcionam como uma assinatura química, denominado “odor da colônia” ou “odor gestalt” (CROZIER & DIX, 1979). Essa assinatura é usada entre as companheiras de ninho como uma forma de comparação com seu próprio perfil químico, possibilitando assim o reconhecimento entre elas. Parte dos compostos químicos que constituem a cutícula são

armazenados na glândula pós faríngeal e transferidos entre os membros da colônia por trofalaxia, lambadura e contato físico (LENOIR *et al.*, 2001).

Estes sinais, que são utilizados no reconhecimento intracolônial, estão sob controle genético e de fatores exógenos, derivados de material do ninho, sazonalidade e da dieta (JUTSUM *et al.*, 1979; LIANG & SILVERMAN, 2000; SILVERMAN & LIANG, 2001; SORVARI *et al.*, 2008; ZWEDEN *et al.*, 2009), sendo que esta variação na caracterização do perfil químico de HCs, mostra o complexo sistema de comunicação química nestes insetos.

O papel dos fatores exógenos na construção da composição química cuticular, sobretudo os HCs foi discutido por Gamboa e colaboradores (1986), por meio do estudo de diferentes colônias da vespa *Polistes fuscatus*, submetidas a condições homogêneas em laboratório. Eles observaram que, controlando alguns fatores externos, entre estes a dieta, as vespas deixaram de se diferenciar entre os indivíduos de diferentes colônias, mostrando que estes compostos sofreram homogeneização. Outros trabalhos mostraram que quantidade, além da qualidade do alimento usado na dieta, modifica o reconhecimento químico em formigas, sendo estas observações realizadas tanto por análise de comportamento, quanto por análise cromatográfica dos compostos cuticulares (LE MOLI *et al.*, 1992; RICHARD *et al.*, 2004; LIANG & SILVERMAN, 2000; SILVERMAN & LIANG, 2001; SORVARI *et al.*, 2008). Sendo assim, a dieta é um dos fatores que certamente contribuem significativamente na construção da assinatura química da colônia, o que conseqüentemente interfere em seu comportamento.

2.4 SISTEMA VENENÍFERO E SUAS VARIAÇÕES.

O singular domínio dos insetos e de outros artrópodes terrestres pode ser atribuído, em parte, a grande diversidade de mecanismos químicos de defesa e predação, presentes em seus corpos. Além das secreções glandulares, alguns artrópodes desenvolveram um sofisticado sistema de armas químicas, entre eles o desenvolvimento de um mecanismo de injeção e produção de veneno, que representaram atributos evolucionários que contribuíram para o seu sucesso evolutivo (WHITMAN *et al.*, 1990).

Como comentado anteriormente, o ferrão se desenvolveu a partir de uma modificação do aparelho de oviposição dos Hymenoptera, localizado na região do gaster destes animais, (MACLINTAL & STARR, 1996), com essa característica não estando presente em todas as espécies da ordem. Particularmente nos himenópteros, as diversas espécies evoluíram seus aparatos químicos conforme sua biologia e comportamento, sendo o ambiente, com suas variações climáticas e com diferentes tipos de fontes alimentares, um fator determinante neste processo (WHITMAN *et al.*,1990).

Entre os aculeatas, segundo Cassier *et al.* (1994), o aparelho de ferrão é composto de modo geral por uma porção secretora, formada pela glândula de Dufuor e glândula de veneno, um saco de armazenamento, um ducto excretor e pelo próprio ferrão (Figura 2.1).

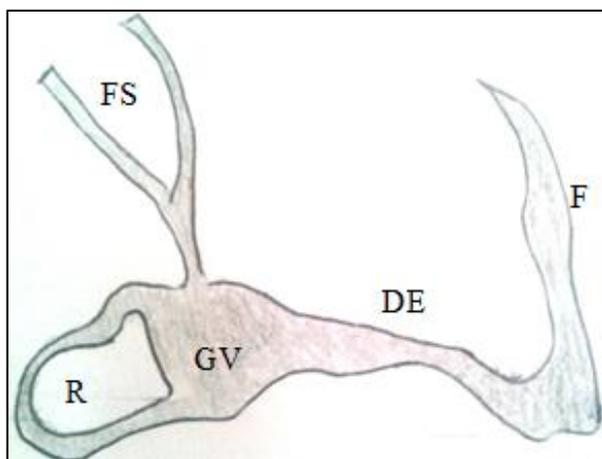


Figura 2.1 Esquema básico, representativo, do aparelho de ferrão da espécie de formiga *Ectatomma brunneum*, composta por: Filamento secretor (FS), Glândula de veneno (GV), Reservatório de veneno (R), Ducto Excretor (DE) e Ferrão.

2.4.1 VENENO

Em formigas, o veneno tem três funções principais, defesa contra predadores, captura de presas e comunicação social (SCHMIDT, 1986). Sem dúvida, a função ofensiva, desempenha o papel mais importante em espécies de formigas predadoras (AIRD E SILVA 1991; COGO *et al.* 1993; DALTRY *et al.* 1996).

O veneno deste grupo, assim como em outros himenópteros, é composto basicamente de complexos de moléculas orgânicas, proteínas, peptídeos, lipídeos, aminas vasoativas (norepinefrina, histamina e dopamina) e algumas enzimas como fosfolipases, hialuronidases e fosfatases (EDSTROM, 1992; LIMA & BROCHETTO-BRAGA, 2003), mas pode ser descrito como predominantemente constituído por proteínas e peptídeos, ou como uma mistura complexa de compostos de baixa massa molecular (PALMA, 2006).

Trabalhos desenvolvidos com várias espécies de animais peçonhentos mostram que os fatores ambientais contribuem na construção da composição do veneno, gerando variações em seus compostos, mesmo dentro de uma única espécie. Esta interferência do meio externo proporciona diferenciação na toxicidade, na concentração e até na especificidade do veneno frente a determinados tipos de presas, sendo estas observações realizadas a partir de técnicas como a cromatografia, eletroforese em gel, análise de letalidade, entre outros (SANTORO *et al.* 1999; ORIVEL & DEJEAN 2001; TSAI *et al.* 2004; BADHE *et al.* 2006; SAPORITO *et al.* 2007). A variação da composição do veneno também é associada à idade dos indivíduos, ao clima, a sazonalidade e a dieta (FERREIRA JUNIOR *et al.*, 2010).

Por outro lado, a variação na composição do veneno, em diferentes populações pode ser explicada pela expressão diferenciada de um conjunto de genes, em resposta as diferentes condições ecológicas e ontogênicas a que estavam expostos (TSAI *et al.*, 2004). Considerando que a função primária da maioria dos venenos é a captura de presas, a seleção natural sobre a composição do veneno se torna uma consequência provável.

A evolução da composição da peçonha foi estudada mais extensivamente em vertebrados, especificamente em cobras. Em um trabalho realizado por Daltry (1996), foi observado que os padrões de variação do veneno na espécie de cobra *Calloselasma rhodostoma*, correlacionaram-se significativamente com a variação na dieta, sendo isso interpretado como reflexo da seleção natural para a alimentação de presas locais. Entretanto, estudos também mostram que algumas espécies se especializaram no sequestro de substâncias do ambiente para compor e até potencializar seu sistema de defesa (RUXTO *et al.* 2004; SAPORITO *et al.* 2007).

Os fatores que interferem na composição do veneno e sua variação dentro de uma mesma espécie têm sido um ramo ativo nas pesquisas recentes. O interesse do estudo da variabilidade intraespecífica do veneno tem aumentado, principalmente, devido as graves

consequências desta variação na eficácia de soros anti-veneno para humanos (HARRISON *et al.*, 2011; CASEWELL *et al.*, 2013). Mais recentemente o veneno de animais, incluindo os Hymenoptera, ganhou destaque em relação ao seu potencial farmacológico (OREN & SHAI, 1997; YAN & ADAMS, 1998; BLAYLOCK, 2000; ORIVEL *et al.*, 2001; ORIVEL & DEJEAN, 2001; ZELEZETSKYA *et al.*, 2005; KOH *et al.*, 2006; SON *et al.*, 2007), sendo que o efeito deste potencial, possivelmente, também pode sofrer interferências das variações do veneno destas espécies.

Ainda que o veneno de himenópteras sociais seja relatado desde o final do século XIX, o conhecimento da composição do veneno de formigas, e de fato, de toda ordem Hymenoptera, é ainda muito limitado, sendo que pouco se sabe a respeito da influência ambiental sobre estes compostos. Essa escassez de dados é relacionada, principalmente, a grande dificuldade em obtenção de uma quantidade suficiente de amostras de peçonha para realização dos estudos mais completos (LIMA & BROCHETO, 2003; FAVREAU *et al.*, 2006).

2.5 ESPÉCIE *Ectatomma brunneum*.

A espécie *Ectatomma brunneum* Smith 1858 (Figura 2.2), apesar de sua ampla ocorrência, ainda tem sua biologia pouco conhecida. O gênero *Ectatomma* apresenta diferenciação morfológica entre suas operárias e as rainhas, com as rainhas sendo ligeiramente maiores que as operárias (ANTONIALLI-JUNIOR & GIANNOTTI 1997).

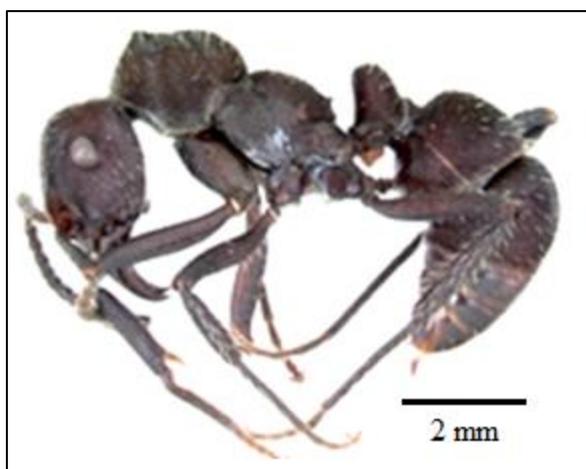


Figura 2.2 Operária da formiga *Ectatomma brunneum*

Esta espécie tem uma vasta distribuição na América Latina, ocorrendo do Panamá até a Argentina (BROWN, 1958). Geralmente se localiza em áreas abertas, tais como bordas de florestas ou clareiras, culturas, pastagens e matas secundárias (KEMPF, 1972). Assim como outras formigas predadoras, a dieta de *E. brunneum* se baseia principalmente em proteínas e carboidrato (PORTER, 1989; EVANS & PIERCE, 1995), sendo que sua fonte proteica, em geral, vem de artrópodes terrestres (MILL, 1982; OVERAL, 1986; GIANNOTTI & MACHADO, 1992; MARQUES *et al.*, 1995).

2.6 ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.

O método mais usual para avaliar a composição do veneno e principalmente da química cuticular é a Cromatografia Gasosa (LORENZI *et al.*, 2004; KROISS *et al.*, 2011; COSTANZI *et al.*, 2013) Esta técnica de análise, apresenta entre suas vantagens, uma grande resolução e alta sensibilidade, sendo que pode ser aplicada em substâncias voláteis ou facilmente volatilizáveis e que sejam estáveis termicamente. A partir do emprego de detectores específicos pode realizar a identificação de diversos componentes nas amostras e permitindo a quantificação dos constituintes em nível de traços nas amostras (COLLINS *et al.*, 2006).

No entanto, nos últimos anos, a técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS, *Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy*) também tem demonstrado ser bastante confiável para leitura dos compostos presentes na cutícula (ANTONIALLI JUNIOR *et al.*, 2007; ANTONIALLI JUNIOR *et al.*, 2008; NEVES *et al.*, 2012; NEVES *et al.*, 2013), sendo que a efetividade da técnica também foi mostrada em outros trabalhos envolvendo diferentes tipos de materiais, como escama de peixe, biodiesel, ferrugem da soja, dejetos de animais, solo e café (HOFMAN *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2009; DU *et al.*, 2010; GORDILLO-DELGADO *et al.* 2012; ALMEIDA *et al.*, 2012).

O Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, se tornou um dos precursores do uso desta técnica espectroscópica para análise de compostos cuticulares em Hymenoptera. Entre os trabalhos realizados com o método, o FTIR-PAS auxiliou na diferenciação de castas e sexo na espécie de formiga

Ectatomma vizottoi (ANTONIALLI JUNIOR *et al.*, 2007), diferenciação intra e interespecífica de populações de *E. brunneum* e *E. vizottoi* (ANTONIALLI JUNIOR *et al.*, 2008), mudanças dos feromônios superficiais ocasionados pela idade em vespas da espécie *Mischocyttarus consimilis* (NEVES *et al.*, 2012), dinâmica dos HCs em vespas do gênero *Mischocyttarus* e mais recentemente tem mostrado sua eficiência na análise do veneno de vespas e formigas (NEVES *et al.*, 2013).

A espectroscopia no infravermelho compreende o estudo da interação da radiação com a matéria, com a fonte de radiação emitindo na faixa do espectro eletromagnético de 4000 a 400 cm^{-1} (SKOOG *et al.*, 2002). A espectroscopia fotoacústica ou PAS (*Photoacoustic Spectroscopy*), como é comumente chamada, é uma técnica que estuda a interação da radiação com a matéria através de um fenômeno conhecido como efeito fotoacústico. Esse efeito, dentro do equipamento de FTIR-PAS, consiste na geração de um sinal acústico através da incidência de radiação modulada na superfície da amostra, que gera pulsos de calor na mesma radiação modulada. O efeito fotoacústico é obtido em uma célula que é constituída por um recipiente fechado, preenchido por gás He (Hélio), no qual existe uma janela de KBr (Brometo de Potássio) que permite a entrada de luz. Um feixe de luz modulada atravessa a janela, atinge a amostra e por ela é absorvida. Estes pulsos provocam flutuações na pressão do gás, que são detectados por um microfone acoplado a uma célula fotoacústica. O esquema do efeito fotoacústico proporcionado pela técnica pode ser visto na Figura 2.3 (IZIDA, 2007).

São basicamente três os mecanismos através dos quais os pulsos de calor produzidos na amostra geram ondas acústicas: expansão térmica, flexão termoelástica e difusão de calor. Eles podem ou não ocorrer ao mesmo tempo, dependendo da amostra (MARQUEZINI, 1990).

A técnica de FTIR-PAS pode ser usando tanto para identificar compostos como na investigação da composição de uma amostra, baseando-se no fato, de que as ligações químicas das substâncias presentes no material analisado possuem frequências de vibrações específicas, que correspondem aos níveis de energia da molécula, chamados níveis vibracionais. Ressaltando que nessa região do espectro a energia dos fótons não é suficiente para excitar os elétrons, apenas induz movimentos vibracionais de átomos e grupos ligados por meio de ligações covalentes. As frequências de vibrações dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas

dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrônico (SMITH *et al.*, 1999; BARBOSA, 2007; HOLLER *et al.*, 2009).

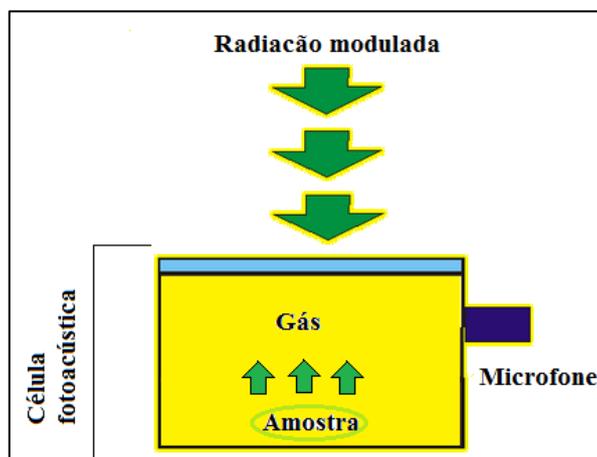


Figura 2.3 Esquema representativo do efeito fotoacústico gerado dentro da célula do equipamento de FTIR-PAS.

Devido à versatilidade da sua forma de detecção fotoacústica, que permite a análise de absorção óptica de materiais opacos na região do infravermelho, a FTIR-PAS pode ser aplicada em diferentes sistemas. A faixa de absorção do infravermelho médio é sensível às vibrações e rotações de grupos químicos moleculares e, sendo assim, é capaz de identificar e distinguir radicais moleculares e os tipos de ligações químicas envolvidas em determinada amostra, sendo este o aspecto mais vantajoso dessa técnica (SMITH, 1999). A radiação de baixa intensidade no qual este método opera, garante uma eficácia na leitura de materiais frágeis, como os materiais biológicos, permitindo que a técnica seja não destrutível, podendo posteriormente reutilizar as amostras para análise em outros procedimentos. Além destas, outras vantagens da técnica incluem muito boa relação sinal-ruído e alta resolução espectral. A varredura espectral não emprega métodos ópticos dispersivos, assim a obtenção dos espectros pode ser realizada em poucos minutos, possibilitando a leitura de um grande número de amostras em um menor espaço tempo (GREENE *et al.*, 1992).

2.7 OBJETIVO.

Uma vez que já foram documentados em outros trabalhos que tanto compostos químicos cuticulares quanto o veneno de insetos sociais são determinados, em parte, por fatores exógenos, sobretudo a dieta, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de fatores exógenos sob a variação intraespecífica da composição química cuticular e do veneno da formiga *E. brunneum*. Também pretendeu-se avaliar a confiabilidade da técnica FTIR-PAS comparando seus resultados com a da técnica de Cromatografia Gasosa com detector de ionização em chama.

REFERÊNCIAS

- AIRD, S. D., SILVA, J. N. Comparative studies enzymatic of brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry**, v. 99, p. 287-294, 1991.
- ALMEIDA, F. S.; LIMA, S. M.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R. Differentiation of Neotropical fish species with statistical analysis of Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy data. **Society for Applied Spectroscopy**, v. 66, n. 7, p. 782-785, 2012.
- ANDRADE, L. H. C.; FREITAS, P. G.; MANTOVANI, B. G.; FIGUEIREDO, M. S.; LIMA, S. M.; RANGEL, M. A. S.; MUSSURY, R. M. Detection of soybean rust contamination in soy leaves by FTIR photoacoustic spectroscopy. **The European Physical Journal Special Topics**, v. 153, p. 539-541, 2008.
- ANTONIALLI- JUNIOR, W. F.; GIANNOTTI, E. Nest architecture and population dynamics of the Ponerinae ant *Ectatomma opaciventre* Roger (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Advanced Zoology**, v. 18, p. 64-71, 1997.
- ANTONIALLI- JUNIOR, W. F.; LIMA, S. M.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform infrared photoacousticspectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 492-499, 2007.
- ANTONIALLI- JUNIOR, W. F.; SUAREZ, 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, p. 559-66, 2008.
- AUSTIN, A. D.; DOWTON, M. **Hymenoptera: Evolution, Biodiversity and Biological Control**. Collingwood-Austrália: CSRIO Publishing, 2000. 468 p.

- BADHE, R. V.; THOMAS, A. B.; HARER, S. L.; DESHPANDE, A. D.; SALVI, N.; WAGHMARE, A. Intraspecific variation in protein pattern of red scorpion (*Mesobuthus Tamulus, Coconsis, Pocock*) venoms from western and southern India. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, p. 612-619, 2006.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos**. Viçosa: UFV, 2007. 189p.
- BILLEN, J. Morphology of exocrine glands in social insects with special emphasis on the contributions by Italian researchers. **Insect Social Life**, v. 5 p. 69-75, 2004.
- BLAYLOCK, R. S. M. Antibacterial properties of KwaZulu Natal snake venoms. **Toxicon**, v. 38, p. 1529–1534, 2000.
- BONAVITA-COUGOURDAN, A., CLEMENT, J. L., LANGE, C. Nestmate recognition: the role of cuticular hydrocarbons in the ant *Camponotus vagus* Scop. **Journal of Entomological Science**, v. 22, n. 1, p. 1–10, 1987.
- BRANDÃO, C. R. F. Família Formicidae. In: BRANDÃO, C. R. F.; CANCELLO, E. M. **Invertebrados terrestres**. Serra Negra-SP: São Paulo: FAPESP, 1999. p. 215-223.
- BRIAN, M. V. **Social Insects, Ecology and Behavioral Biology**. London: Chapman and Hall, 1983. p. 377.
- BROWN- JUNIOR, W. R. Contributions toward a reclassification of the Formicidae. II Tribe Ectatomminae (Hymenoptera). **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard**, v. 118, p. 175-362, 1958.
- BROWN- JUNIOR, W. L. Diversity of ants. In: AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity**. Washington: Smithsonian Institution Press, 2000. p. 45-79.
- CAMPOS-FARINHA, A. E. C.; JUSTI- JUNIOR, J.; BERGMANN, E. C.; ZORZEON, F. J.; NETTO, S. M. R. **Formigas urbanas**. São Paulo, SP: Instituto Biológico, 1997. 20 p.
- CASEWELL, N. R.; WÜSTER, W.; VONK, F. J.; HARRISON, R.A.; FRY, B. G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. **Cell Press**, v. 28, p. 219–229, 2013.
- CASSIER, P.; TEL-ZUR, D.; LENSKY, Y. The sting sheaths of honey bee workers (*Apis mellifera* L.): Structure and alarm pheromone secretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 40, p. 23-32, 1994.
- COGO, J. C.; PRADO- FRANCISCHETTI, J.; CRUZ-HOFLING, M.A.; CORRADO, A.P.; RODRIGO-SIMIONI, L. Effects of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon**, v. 31, p. 1237-1247, 1993.
- 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, 2013.

CROZIER, R. H.; DIX, M. W. Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social Hymenoptera. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 4, p. 217-224, 1979.

DALTRY, J. C.; WUSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and venom evolution. **Nature**, v. 379, p. 537-540, 1996.

DELABIE J. H. C.; FERNÁNDEZ, F. Relaciones entre hormigas y “homópteros” (Hemiptera: Sternorrhyncha y Auchenorrhyncha). In: FERNÁNDEZ, F. **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 2003. p. 181-200.

DELABIE J. H. C.; OSPINA, M.; ZABALA, G. Relaciones entre hormigas y plantas: una introducción. In: FERNÁNDEZ, F. **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 2003. p. 167-180.

DU, C.; ZHOU, J.; WANG, H.; CHEN, X.; ZHU, A.; ZHANG, J. Determination of soil properties using Fourier transform mid-infrared photoacoustic spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 49, p. 32-37, 2009.

DU, C.; GUIQIN, Z.; JIANMIN, Z.; HUOYAN, W.; XIAOQIN, C.; YUANHUA, D.; HUI, W. Characterization of animal manures using mid-infrared photoacoustic spectroscopy. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6273-6277, 2010.

EDSTROM, A. **Venomous and Poisonous Animals**. Malabar: Krieger Publishing Company, 1992. 210 p.

EVANS, J. D.; PIERCE, N. E. Effects of diet quality and queen number on growth in Leptothoracine ant colonies (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of the New York Entomological Society**, v. 103, p. 91-99, 1995.

FAVREAU, P.; MENIN, L.; MICHALET, S.; PERRET, F.; CHENEVAL, O.; STOCKLIN, M.; BULET, P.; STOCKLIN, R. Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case application with single arthropod specimen. **Toxicon**, v. 47, p. 676-687, 2006.

FERNÁNDEZ, F.; PALACIO, E. E. Sistemática y filogenia de las hormigas: breve repaso a propuestas. In: FERNÁNDEZ, F. **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 2003. p. 29-44.

FERNÁNDEZ, F.; SENDOYA, S. List of Neotropical ants (Hymenoptera: Formicidae). **Biota Colombiana**, Bogotá, v. 5, p. 3-93, 2004.

FERREIRA JUNIOR, R. S.; SCIANI, J. M.; MARQUES- PORTO, R.; LOURENÇO- JUNIOR, A.; ORSI, R.O.; BARRAVIEIRA, B.; PIMENTA, D. C. Africanized honey bee

(*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. **Toxicon** v. 56, p. 355–362, 2010.

FOWLER, H. G.; FORTI, L. C.; BRANDÃO, C. R. F.; DELABIE, J. H. C.; VASCONCELOS, H. L. Ecologia nutricional de formigas. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991. p. 131-22.

GAMBOA, G. J. The evolution and ontogeny of nestmate recognition in social wasps. **The Annual Reviews Entomology**, v. 31, p. 431-454, 1986.

GASTON, K.J. 1993. Spacial patterns in the description and richness of the Hymenoptera. In: LA SALLE, J.; GAULD, I. D. **Hymenoptera and Biodiversity**. Wallingford, United Kingdom: CAB International, 1993. p. 277–293.

GIANNOTTI, E.; MACHADO, V. L. L. Notes on the foraging of two species of Ponerinae ants: Food and resources and daily hunting activities (Hymenoptera: Formicidae). **Bioikos**, v. 6, p. 7-17, 1992.

GONÇALVES, C. Saúvas do Sul e Centro do Brasil. **Boletim Fitossanitário**, São Paulo, n. 2, v. 3-4, p. 183-218, 1945.

GORDILLO- DELGADO, F.; MARÍN, E. CORTÉS- HERNÁNDEZ, M.; MEJÍA-MORALES, C.; GARCÍA- SALCEDO, A. J. Discrimination of organic coffee via Fourier transform infrared-photoacoustic spectroscopy. **Journal or the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 2316-2319, 2012.

GORDON, D. **Formigas em ação: como se organiza uma sociedade de insetos**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar Editor, 2002. 144 p.

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, EUA: Cambridge University Press, 2005. 755 p.

HARRISON, R. A.; COOK, D. A.; RENJIFO, C.; CASEWEEL, N. R.; CURRIER, R. B.; WAGSTAFF, S. C. Research strategies to improve snakebite treatment: challenges and progress. **Journal Proteomics**, v. 74, p. 1768–80, 2011.

HOFMAN, M.; PASIECZNA- PATKOWSKA, S.; RYCZKOWSKI, J.; WACHOWSKI, L. Identification of functional group on the surface of modified organic materials using the FT-IR/PAS method. **The European Physical Journal Special Topics**, v. 15, p. 325-328, 2008.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Cambridge: Belknap Press, 1990.732p.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1056p.

IZIDA, T. **Distinção de Espécies e Castas de Formigas com a Técnica FTIR-PAS**. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em física) - Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Dourados, 2007.

JUTSUM, A. R.; SAUNDERS, T. S.; CHERRETT, J. M. Intraspecific aggression in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. **Animal Behaviour**, v. 27, p. 839-844, 1979.

KEMPF, W. W. Catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Entomologica**, v. 15, p. 1-344, 1972.

KOH, D. C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 3030-3041, 2006.

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.

LAHAV, S.; SOROKER, V.; HEFETZ, A.; VANDER- MEER, R. K. Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. **Naturwissenschaften**, v. 86, p. 246-249, 1999.

LE- MOLI, F.; MORI, A.; GRASSO, D. A. Nestmate and conspecific nonnestmate recognition in *Formica cunicularia* Latr.: the effect of diet differences. In: BILLEN, J. **Biology and evolution of social insects**. Leuven, Belgium: Leuven University Press, 1992. p. 161–165.

LENOIR, A.; FRESNEAU, D.; ERRARD, C.; HEFETZ, A. Individuality and colonial identity in ants. In: DETRAIN, C.; DENEUBOURG, J. L.; PASTEELS, J. **Information Processing in Social Insects**. Basel, Switzerland: Birkhauser-Verlag, 1999. p. 219-237.

LENOIR, A.; CUISSET, D.; HEFETZ, A. Effects of social isolation on hydrocarbon pattern and nestmate recognition in the ant *Aphaenogaster senilis* (Hymenoptera: Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 48, p. 101-109, 2001.

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.

LIÉNARD, M.A.; STRANDH, M.; HEDENSTROM, E.; JOHANSSON, J.; LOFSTEDT, C. Key biosynthetic gene subfamily recruited for pheromone production prior to the extensive radiation of Lepidoptera. **BioMed Central**, v. 8, p. 1-15, 2008.

LIMA, S. M.; IZIDA, T.; FIGUEIREDO, M. S.; ANDRADE, L. H. C.; DEL- RÉ, P. V.; JOREGE, N.; BUBA, E.; ARISTONE, F. Analysis of biodiesel and frying vegetable oils by means of FTIR photoacoustic spectroscopy. **The European Physical Journal Special Topics**, v. 153, p. 535-537, 2008.

LIMA, P. R. M.; BROCHETTO- BRAGA, M. R. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 9, p. 149-162, 2003.

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.

MACLINTAL, E. A.; STARR, C. K. Comparative morphology of the stinger in the social wasp genus *Ropalidia* (Hymenoptera: Vespidae). **The Memoirs of the Entomological Society of Washington**, v. 17, p. 108-115, 1996.

MARQUES, O. M.; VIANA, C. H. P.; KAMOSHIDA, M.; CARVALHO, C. A. L.; SANTOS, G. M. M. Hábitos de nidificação e alimentares de *Ectatomma quadridens* (Fabricius, 1793) (Hymenoptera, Formicidae) em Cruz das Almas – Bahia. **Insecta**, v. 4, p. 1-9, 1995.

MARQUEZINI, M. V. **Aplicação da Espectroscopia Fotoacústica ao Estudo “in vivo” da toxicidade metálica em plantas**. Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Universidade Estadual de Campinas –UNICAMP, 1990.

MARTIM, S.; DRIJFHOUT, F. A Review of Ant Cuticular Hydrocarbons. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, p. 1151-1161, 2009.

MILL, A. E. Faunal studies on termites (Isoptera) and observation on their ants predator (Hymenoptera: Formicidae) in the Amazon Basin. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 26, p. 253-256, 1982.

NEVES, E. F.; ANDRADE, L. H. C.; SUAREZ, 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, p. 1891-1898, 2012.

NEVES, E. F.; MONTAGNA, T. S.; ANDRADE, L. H. C.; SUÁREZ, Y. R.; LIMA, S. M.; ANTONIALLI- JUNIOR, W. F. Social parasitism and dynamics of cuticular hydrocarbons in paper wasp of the *Mischocyttarus*. **Journal of Kansas Entomological Society**, v. 86, p. 69-77, 2013.

OREN, Z.; SHAI, Y. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure-function study. **Biochemistry**, v. 36, p. 1826–1835, 1997.

ORIVEL, J.; REDEKER, V.; LE- CAER, J.P.; KRIER, F.; REVOL- JUNELLES, A. M.; LONGEON, A.; CHAFFOTTE, A.; DEJEAN, A.; ROSSIER, J. P. New antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. **The Journal Biological Chemistry**, v. 276, p. 17823–17829, 2001.

ORIVEL, J.; DEJEAN, A. Comparative effect of the venoms of ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera Ponerinae). **Toxicon**, v. 39, p. 195–201, 2001.

OVERAL, W. L. Recrutamento e divisão de trabalho em colônias naturais da formiga *Ectatomma quadridens* (Fabr.) (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi (Zoologia)**, v. 2, p. 113-135, 1986.

PALMA, M. S. Insect Venom Peptides. In: KASTIN, A. J. **The Handbook of Biologically Active Peptides**. Oxford: Academic Press, 2006. p. 409-416.

PORTER, S. D. Effects of diet on the growth of laboratory fire ant colonies (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Kansas Entomological Society**, v. 62, n. 2, p. 288-291, 1989.

RICHARD, F. J.; HEFETZ, A.; CHRISTIDES, J. P.; ERRARD, C. Food influence on colonial recognition and chemical signature between nestmates in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. **Chemoecology**, v. 16, p. 9-16, 2004.

RUXTON, G. D.; SHERRATT, T. N.; SPEED, M. P. **Avoiding attack: the evolutionary ecology of crypsis, warning signals, and mimicry**. Oxford: Oxford University Press, 2004. 249 p.

SANTORO, M. L.; SOUSA- E- SILVA, M. C. C.; GONÇALVES, L. R. C.; SANTOS, S. M. A.; FERREIRA, I. L. L.; SAIKI, M.; PERES, C. A.; SANO-MARTINS, I. S. Comparison of the biological activities of three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 112C, p. 61-73, 1999.

SAPORITO, R. A.; DONNELLY, M. A.; NORTON, R. A.; GARRAFFO, H. M.; SPANDE, T. F.; DALY, J. W. Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 104, p. 8885-8890, 2007.

SCHMIDT, J. O. Chemistry, pharmacology and chemical ecology of ant venoms. In: PIEK, T. **Venoms of the Hymenoptera, Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects**. London: Academic Press, 1986. p. 425-508.

SILVERMAN, J.; LIANG, D. Colony disassociation following diet partitioning in a unicolonial ant. **Naturwissenschaften**, v. 88, p. 73-77, 2001.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SMITH, B. C. **Infrared spectral interpretation: a systematic approach**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1999. 288 p.

SON, D. J.; LEE, J. W.; LEE, Y. H.; SONG, H. S.; LEE, C. K.; HONG, H. T. Therapeutic application of anti-arthritis, pain releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology & Therapeutic**, v. 115, p. 246-270, 2007.

SORVARI, J.; THEODORA, P.; TURILLAZZI, S.; HAKKARAINEN, H.; SUNDSTEÖM, L. Food resources, chemical signaling, and nestmate recognition in the ant *Formica aquilonia*. **Behavioral Ecology**, v. 19, p. 441-447, 2008.

STORK, N. E. Measuring global biodiversity and its decline. In: REAKA-KUDLA, M. L.; WILSON D. E.; WILSON, E. O. **Biodiversity II**. Washington, EUA: Joseph Henry Press, 1997. p. 41-68.

TSAI, I.-O.; WANG, Y.-M.; CHEN, Y.-H.; TSAI, T.-S.; TU, M.-C. Venom phospholipases A 2 of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. **Biochemical Journal**, v. 223, p. 215-223, 2004.

ULRICH, W. The number of species of Hymenoptera in Europe and assessment of the total number of Hymenoptera in the world. **Polish Journal of Entomology**, v. 68, p. 151–164, 1999.

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.

ZELEZETSKYA, I.; PAGB, U.; ANTCHEVAA, N.; SAHLB, H. G.; TOSSIA, A. Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 434, p. 358–364, 2005.

WHITMAN, D. W.; BLUM, M. B.; ALSOP, D. W. Allomones: Chemicals for Defense. In: EVANS, D. L.; SMITH, J. **Insect Defenses**. Albany, USA: Ed. State University of New York Press, 1990, p. 289–351.

YAN, L; ADAMS, M. E. Lycotoxins, Antimicrobial Peptides from Venom of the Wolf Spider *Lycosa carolinensis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 2059–2066, 1998.

CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA, MANUTENÇÃO E PREPARO DOS EXEMPLARES DE *E. brunneum* PARA ANÁLISE.

3.1.1 ESTUDO DO EFEITO DA DIETA SOBRE OS COMPOSTOS QUÍMICOS CUTICULARES.

Foram coletadas 4 colônias de *E. brunneum*, 3 destas nidificadas no entorno do campus da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (valores aproximados entre os três locais - 22°11'53.32" S e 54°55'50.90" O), com no mínimo 30 metros de distância entre cada um dos ninhos, em ambiente com predominância de gramíneas e espécies arbustivas, interferência antrópica e edificações, chamada de área de coleta 1, e uma colônia a poucos metros de uma área de mata semidecídua com cerca de 800.000 m² (22°12'45.78"S e 54°54'43.15" O), chamada de área de coleta dois.

Ambas as localidades estavam no entorno de áreas rurais, como pode ser visto na Figura 3.1. As coletas foram realizadas em dezembro de 2012, fevereiro, março e abril de 2013, compreendendo a estação do verão.

Para extração das colônias, conforme método descrito por Vieira & Antonialli-Junior (2006), foi escavado ao entorno do ninho subterrâneo, em formato de meia lua, uma abertura para facilitar o encontro das câmaras e retirada dos indivíduos da colônia, como pode ser visto na Figura 3.2.

Logo após as coletas, em torno de 15 operárias foram separadas, anestesiadas e sacrificadas por congelamento, para servirem como amostra controle de uma condição natural de dieta. Todos os outros indivíduos da colônia foram transferidos para laboratório e acondicionados em ninhos artificiais para controle das condições físicas e, sobretudo da alimentação (Figura 3.3). Os ninhos foram acoplados a uma área de forrageamento individual para cada colônia, onde foram disponibilizados diariamente água e mel e, em

dias alternados, larvas de último estágio da espécie de besouro *Tenebrio molitor*. O número de larvas fornecido foi proporcional ao número de indivíduos da colônia.



Figura 3.1 Áreas de coleta 1 e 2, imagens retirados do Google Earth.



Figura 3.2 Escavação do ninho de *E. brunneum* para retirada dos indivíduos da colônia.



Figura 3.3 Manutenção das colônias em laboratório

Devido à ausência na literatura de um período específico necessário para se estabelecer algum efeito da alteração da dieta sobre a composição da química cuticular, as colônias foram mantidas por 30 dias em condições controladas, antes da primeira análise. O número de indivíduos usados para cada análise variou entre 9-15, de acordo com o tamanho da população, para que não comprometesse a manutenção da colônia até o final dos experimentos. Outra amostragem foi retirada e analisada aos 60 dias (Tabela 3.1). Todos os indivíduos, como os controles, assim que coletados para as análises foram anestesiados, sacrificados e armazenados por congelamento, a fim de evitar a perda das substâncias presentes na cutícula.

Tabela 3.1 Número de indivíduos utilizados para cada uma das amostragens.

Amostras	Número de indivíduos			
	Colônia #1	Colônia #2	Colônia #3	Colônia #4
Controle	11	14	13	14
30 dias	11	15	15	15
60 dias	9	15	15	15

As análises foram realizados na região do gáster, que segundo Cuvillier-Hot et al. (2001) é onde está presente a maior concentração de HCs. Os gásteres foram extraídos com auxílio de pinça e tesoura microcirúrgica.

Para avaliar se os compostos encontrados na dieta estavam presentes na cutícula das formigas, após diferentes períodos de dieta controlada, tanto o mel quanto larvas de *T. molitor* também foram submetidos às mesmas análises. Portanto, 30 larvas de último estágio de *T. molitor*, após serem anestesiadas e sacrificadas por ação de baixa temperatura, foram separadas na mesma proporção para o uso das duas ferramentas de análise, FTIR-PAS e Cromatografia gasosa. Seis amostras do mel foram separadas para análise, sendo que três destas porções de mel foram utilizadas para leitura de FTIR-PAS, 291 µl para cada amostragem e os outros 3 utilizados para cromatografia, contendo cada repetição 100 µl. As larvas de *T. molitor* analisadas faziam parte da mesma criação mantida em laboratório e que foram utilizada para alimentação das colônias, assim como o mel também foi o mesmo utilizado na dieta.

Para o uso da técnica de FTIR-PAS, os abdomens e as larvas de *T. molitor* foram submetidos à secagem em dessecadora à vácuo, por no mínimo 48h, a fim de reduzir o teor de água que pode interferir nas leituras por infravermelho. Não houve preparação prévia para leitura do mel.

Para leitura das mesmas amostras de formigas por Cromatografia Gasosa com detector de ionização em chamas (CG-DIC), a química cuticular dos gásteres, neste caso, especificamente os HCs foram extraídos em 5 mL de hexano (grau HPLC – VETEC) em banho ultrassônico por 60 min. O procedimento de extração foi realizado em triplicata e os sobrenadantes foram unidos ao final. Posteriormente o solvente foi eliminado em capela de exaustão e o extrato seco dissolvido em 100 µL de hexano para as análises CG-DIC.

Para avaliar a relação entre os itens alimentares, mel e *Tenebrio molitor*, por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), os alcanos destas amostras foram extraídos em 5 mL de hexano (grau HPLC – VETEC) em banho ultrassônico por 60 min. O procedimento de extração foi realizado em triplicata e os sobrenadantes foram unidos ao final. Posteriormente o solvente foi eliminado em capela de exaustão e o extrato seco dissolvido em 100 µL de hexano para realização das análise.

3.1.2 ESTUDO DA INFLUÊNCIA AMBIENTAL SOBRE O VENENO DE *E. brunneum* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE FTIR-PAS

Foram coletadas operárias forrageadoras de 4 populações de *E. brunneum*, três destas de diferentes locais da região de Dourados – Mato Grosso do Sul, e uma de Ilhéus – Bahia, no período de setembro à outubro de 2013, período que correspondeu ao inverno. Os pontos selecionados para coleta em Dourados foram uma área de mata semidecídua; na área urbana da cidade, todas em áreas gramadas e afetada pela ação antrópica; e outra no campus da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, instalada na área rural da cidade, com predominância de gramíneas, espécies arbustivas, com edificações e circulação de pessoas, que foi chamada neste trabalho como área intermediária. As coletas de Ilhéus foram realizadas em uma área de monocultura de Cacau, onde está localizado o CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira). Portanto os quatro locais de coleta apresentavam diferenças ambientais.

Todo o procedimento de captura dos indivíduos foi realizado por coleta ativa, de forma aleatória, de operárias em atividade de forrageamento. Em todas as áreas de coleta, buscou-se diversificar os locais de captura a fim de obter uma maior representação da população local, aumentando a variação genética nas amostragens. De cada uma das áreas, foram recolhidos 75 indivíduos. Logo após as coletas, os indivíduos foram anestesiados, sacrificados e armazenados por congelamento, a fim de preservar as amostras.

A extração do reservatório de veneno ocorreu por dissecação, sendo que todos os filamentos glandulares livres e o ferrão foram removidos. Portanto, o material foi removido puxando o ferrão, presente na extremidade do gáster, com auxílio de uma pinça e luva, até que o material interno fosse retirado e depois limpo com o auxílio de outra pinça (Figura 3.4). Assim que extraídos, os reservatórios com veneno foram distribuídos e rompidos em um cadinho, para posterior leitura na célula fotoacústica. Todas as análises foram realizadas em no máximo 15 minutos após a dissecação, a fim de prevenir a degradação das toxinas.

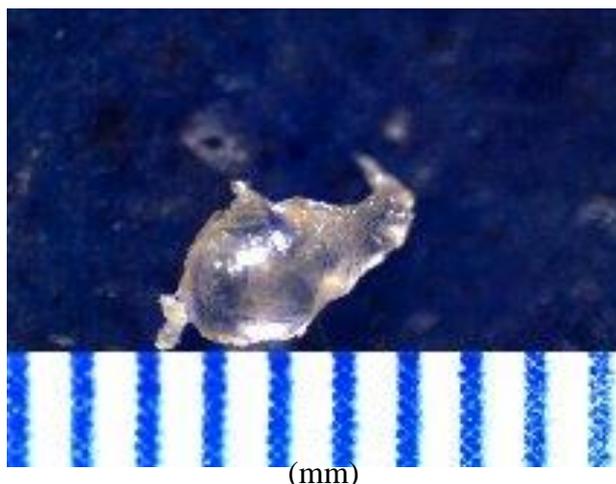


Figura 3.4 Veneno, junto ao seu saco de armazenamento, extraído da formiga da espécie *E. brunneum*. Régua em milímetros (mm).

Foram realizadas em torno de 15 leituras, com cinco amostras cada, para todas as populações analisadas. Tentativas de leitura com um menor número de indivíduos para cada amostragem mostraram um sinal pequeno, dificultando as análises comparativas. Portanto, a partir de testes, as cinco amostras foram unidas para aumentar a área de absorção do infravermelho e assim obter resultados mais precisos com a técnica. Para a utilização da técnica de FTIR-PAS não houve nenhum tipo de preparo específico para amostra.

3.2 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LEITURA DAS AMOSTRAS.

3.2.1 ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Foram analisados por infravermelho médio o material cuticular de todos os grupos (controle e sob dieta controlada durante 30 e 60 dias) e a dieta de mel e *Tenebrio molitor*, oferecidos aos animais mantidos em laboratório para o estudo da influência da dieta sobre a assinatura química da colônia. Também foi avaliado pela técnica, o veneno para o estudo da interferência das diferenças ambientais sobre a peçonha de *E. brunneum*.

A FTIR-PAS foi realizada usando um espectrofotômetro Thermo Nicolet Nexus 670 com detecção fotoacústica, na faixa espectral de 4000-400 cm^{-1} , área que abrange a região conhecida como impressão digital (1500 e 400 cm^{-1}). Durante o experimento, o espectrômetro foi purgado com ar comprimido seco, a fim de remover qualquer vapor de água e CO_2 . A célula fotoacústica foi purgada com gás hélio antes de cada leitura. Como referência para normalização, foi utilizado um corpo de carbono negro para coletar o espectro da fonte de infravermelho, sendo que novos espectros de referência foram coletados a cada 100 minutos. Os espectros foram obtidos com a média de 128 varreduras das amostras, com resolução de 16 cm^{-1} . Para posterior análise comparativa, os espectros foram todos normalizados.

3.2.2 CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO EM CHAMA (CG-DIC)

Foram analisados pela técnica de CG-DIC a leitura dos alcanos presentes nos HCs dos animais mantidos em laboratório para o estudo da influência da dieta sobre o perfil cuticular, assim como os indivíduos controle (em dieta natural) que foram separados durante a coleta.

O GC-DIC (Focus, GC, Thermo Scientific - San Jose, USA) foi equipado com uma coluna capilar OV-5 da marca Ohio (Ohio, USA), com composição de 5% de fenil-dimetilpolisiloxano em sílica fundida capilar, tendo as dimensões de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 μm de espessura de filme, usando nitrogênio como gás carregador à pressão constante de 0,8 bar. As análises foram realizadas em modo splitless com injeção de 1 μL e temperaturas do injetor e detector de 300°C. A temperatura do forno teve a seguinte programação: rampa de aquecimento com temperatura de 50 até 85°C a uma velocidade de 5°C min^{-1} ; depois, aumentando a uma velocidade de 8°C min^{-1} até 280°C; e a uma velocidade de 10°C min^{-1} até 300°C, mantendo nesta temperatura por 35 min. Os cromatogramas foram registrados pelo programa GC Solution. Os compostos químicos foram identificados baseados no padrão de hidrocarbonetos lineares de C_{20} a C_{31} (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano) por comparação de tempos de retenção.

3.2.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM)

Para avaliar a relação entre os itens alimentares, mel e *Tenebrio molitor*, a concentração de alcanos foi verificada com a técnica de CG-EM.

As análises de CG-EM foram realizadas num cromatógrafo gasoso (GC-17, Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com detector de espectroscopia de massa (QP 5050), usando uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J & W, 5% de fenil-dimetilpolysiloxano), (30 m de comprimento x 0,25 mm diâmetro, 0,25 µm de espessura de filme), sob as seguintes condições: gás carregador de hélio (99,999% e velocidade de fluxo de 1,0 mL min⁻¹); volume de injeção de 1 µL, razão split de (1:20), com temperatura de forno inicial de 50°C mantendo por 10 min e após aumentando até 85°C a 5°C min⁻¹ e aumentando até 280°C a 3 °C min⁻¹ mantendo por 30 min. Temperatura do injetor de 250°C e as temperaturas do detector de quadrupolo e da linha de transferência foram de 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. As identificações foram realizadas por comparação dos espectros de massas obtidos com a base de dados da NIST 2.0 e dados da literatura (ADAMS, 2001) e para os alcanos lineares estes também foram confirmados pelo uso de uma mistura padrão de C₈ a C₃₁ (10 µg mL⁻¹ em hexano) por comparação de tempos de retenção.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As possíveis diferenças entre os grupos controle e sob dieta controlada entre os resultados obtidos por ambas as técnicas, foram avaliadas por uma função discriminante (DFA – *Discriminant Function Analysis*), separando como variáveis as intensidades de absorção dos principais grupos funcionais encontrados nos espectros de infravermelho e a área relativa dos alcanos selecionados no GC-FID. Os valores obtido para as análises do veneno, por FTIR-PAS, para as quatro populações de *E. brunneum*, também foram avaliadas pela mesma análise estatística.

Este método estatístico encontra uma combinação linear das variáveis que melhor explicam as diferenças entre os grupos analisados, sendo estes definidos a priori (Reis, 1988). Portanto, a análise discriminante é uma técnica confirmatória. Para discriminação, estabelecem-se funções das variáveis observadas que sejam responsáveis ou possam explicar as diferenças entre grupos. Para a alocação ou classificação, determinam-se as funções que além de separar as populações sejam capazes de alocar ou classificar novos indivíduos em um dos grupos (FERREIRA, 2011).

O método gera, ao final, valores que devem ser considerados para compreensão dos resultados, sendo esses: o p , que é o nível de significância do resultado, especificamente, o valor de p representa a probabilidade de erro envolvida em aceitar o resultado observado como válido, isto é, como representativo dos grupos avaliados, sendo que seu valor apresenta o nível aceitável quando o p é menor que 5%, ou 0,05; O Wilks's lambda, que é usado para denotar a significância estatística do poder discriminatório da função discriminante, com o valor do teste podendo variar de 0,0 a 1,0 considerando-se que, quanto mais próximo de 1,0, menor será o poder discriminatório da função, e ao inverso, quanto menor o seu valor, maior o grau de diferenciação; e o F que de forma simples, nos diz o quanto as médias desses grupos não são iguais.

A distância ao quadrado de Mahalanobis foi utilizada para percepção das alterações entre o controle e os dois diferentes períodos de manutenção da dieta controlada, assim como na diferença individual entre a composição química do veneno das quatro populações de *E. brunneum*.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publ. Corp. Carol Stream, 2001. 469p

CUVILLIER-HOT, V.; COBB, M.; MALOSSE, C.; PEETERS, C. Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queen less ant. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 485-493, 2001.

FERREIRA, D. F. Estatística multivariada. 2. Ed. Lavras: UFLA, 2011. 675 p.

REIS, S. F. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 5, n. 4, p. 571-580, 1988.

VIEIRA, A. S.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F. Populational fluctuaion and nest architecture of *Ectatomma brunneum* (Hymenoptera, Formicidae) in remaining areas of pasture, Dourados – MS, Brasil. **Sociobiology**, v. 47, p. 275-287, 2006.

CAPÍTULO 4. INFLUÊNCIA DA DIETA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA CUTICULAR DA *Ectatomma brunneum*: FTIR-PAS COMO MÉTODO EM POTENCIAL

Neste capítulo é apresentado um artigo referente à primeira parte da dissertação, a qual avaliou a influência da dieta sobre a composição química cuticular da espécie *Ectatomma brunneum*. Neste trabalho, a espectroscopia fotoacústica no infravermelho médio por transformada de Fourier foi aplicada pela primeira vez para esse propósito, de maneira que sua eficiência também foi avaliada. Os resultados de absorção infravermelha foram interpretados com análise estatística dos principais modos vibracionais observados nos espectros, os quais estão relacionados principalmente a hidrocarbonetos. Esse artigo foi preparado nos moldes da revista Journal of Chemical Ecology, a qual está estratificada no Qualis A1 da área de Ciências Ambientais da CAPES, com Fator de Impacto de 2.462 (ano base 2012). Ele foi submetido para apreciação da revista em 11/12/2013.

THE ROLE OF DIET IN THE CUTICULAR CHEMICAL COMPOSITION OF *Ectatomma brunneum*: FTIR-PAS AS A POTENTIAL TOOL

R.C. BERNARDI¹, E.L.B. FIRMINO¹, M.C. PEREIRA², L.H.C. ANDRADE¹, C.A.L. CARDOSO¹, Y.R. SÚAREZ¹, W.F. ANTONIALLI-JR¹, S.M. LIMA^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, CEP 79804-970, C.P. 351, Dourados, MS, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados, CEP 79804-970, C.P. 332, Dourados, MS, Brazil.

Abstract - The cuticular chemical composition is the main responsible in the recognition of nestmates in social insects, thus functioning as a chemical signature of the colony. Several studies show that the structure of cuticular chemical suffers interferences from

genetic and exogenous factors, including the diet. In this study, various colonies of the *Ectatomma brunneum* ant were removed from their natural environmental and housed in a laboratory to control their diet and to monitor the response of the cuticular chemical composition. Analyses were performed using the well-known gas chromatography method and the less frequently used Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (FTIR-PAS) method, both coupled with statistical interpretation. To the best of our knowledge, the latter method was used for the first time for this purpose, and the results indicate that it is a useful technique for application in biological and natural systems. The obtained results show changes in the chemical signature with food traces in the first 30 days under feed control. Therefore, the genetic information may not be the only criterion to describe the chemical signature of a species because environmental variations also influence the recognition signals. Furthermore, these results reinforce the reliability of the FTIR-PAS method compared with a more common technique.

Key-words - Chemical Signals, Colony Odor, Hymenoptera, Ectatomminae, FTIR-PAS.

INTRODUCTION

Social insects, especially ants, have developed throughout their evolution an efficient system of chemical signals, which are the basis for the insects' social structure, allowing for recognition and communication among the individuals of the colony. The ability to discriminate among nestmates, undoubtedly became one of the selective forces for the evolution of insect societies (Lenoir et al. 1999). The genetic structure for the production of these chemical signals was already present in the early generations of ants and was retained in subsequent generations (Liénard et al. 2008). Ants can be compared to a chemical factory, producing chemicals that spread throughout their bodies by a system of more than fifty different exocrine glands (Billen 2004); most are connected to the production of chemicals that act during intraspecies communication, which are called pheromones (Billen and Morgan 1998). Due to their abundance, the ease of maintenance of their colonies in the laboratory and the variety of behavior they display, these ants have

become the main system for chemical recognition studies among social insects (Martin and Dryfhout 2009).

Currently, 12 functional categories of communication are known in social insects, and these are mostly chemical in nature (Holldober and Wilson 1990). Among the chemicals involved, the main substances responsible for the codification of the chemical signals of recognition in social insects are, especially in ants, the cuticular hydrocarbons (HCs), also called superficial pheromones (Lahav et al. 1999; Lenoir et al. 1999). These compounds, apart from their primary function of protection against microorganisms, toxins and desiccation (Lenoir et al. 2001), play determining roles in the inter- and intraspecies recognition among nestmates and even in the differentiation of castes (Lenoir et al. 1999; Antonialli Jr et al. 2007; Antonialli Jr et al. 2008).

Within a single species of social insects, the qualitative profile of HCs present in the cuticular chemical is practically uniform, varying only in its relative proportion according to the origin of its colony (Bonavita-Cougourda et al. 1987). These compounds work as a common chemical signature, named a “colony odor” or a “gestalt odor” (Crozier and Dix 1979). This signature is used among the nestmates for comparison with the chemical profile of an individual, so that recognition can happen. A portion of the chemicals that constitute the HCs present in the cuticle are stored in the post pharyngeal gland and transferred among the members of the colony by trophallaxis, allogrooming and physical contact (Lenoir et al. 2001).

The signals used in intracolony recognition are under genetic control and exogenous factors, which are derived from the nest material, seasonality and diet (Jutsum et al. 1979; Liang and Silverman 2000; Silverman and Liang 2001; Sorvari et al. 2008; Zweden et al. 2009). Therefore, the variation in the chemical profile characterization of cuticle shows the complex system of chemical communication among these insects.

The role of exogenous factors in the composition of cuticular chemical was discussed by Gamboa et al. (1986), by studying different colonies of the *Polistes fuscatus* wasp species under the homogeneous conditions of a laboratory. They observed that after control of the external factors, including the diet, wasps stopped distinguishing among individuals of different colonies, showing that the cuticular profiles started becoming homogeneous. Other works show that the diet modifies the chemical recognition of ants and that even the amount, in addition to the quality of the food can be responsible for these

changes (Le Moli et al. 1992; Richard et al. 2004; Liang & Silverman 2000; Silverman & Liang 2001; Sorvari et al. 2008). Thereby, it seems that the diet is one of the factors that certainly contributes significantly in the construction of the chemical signature of the colony, which consequently interferes with their behavior.

The most frequently used method to evaluate the composition of cuticular chemical in insects is gas chromatography (GC). However, in recent years, Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (FTIR-PAS) was introduced to analyze these chemical compounds, such as hydrocarbons and protein, in ants and wasps (Antoniali Jr. et al. 2007; Antoniali Jr. et al. 2008; Neves et al. 2012; Neves et al. 2013). The effectiveness of this technique has been shown in several studies involving other types of samples (Hofman et al. 2008; Lima et al. 2008; Andrade et al. 2008; Du et al. 2009; Du et al. 2010; Gordillo-Delgado et al. 2012; Almeida et al. 2012). Due to the versatility of the photoacoustic detection method, optical analyses of opaque materials in the mid-infrared region are enabled, and the FTIR-PAS can be applied in a variety of systems. The mid-infrared absorption is sensitive to vibrations of molecular chemical groups; thus, it is capable of identifying and distinguishing functional groups and the types of chemical bonds involved in the sample, which is the most useful aspect of this technique (Smith 1999). The low intensity radiation regime, in which this technique operates, ensures efficiency in the reading of fragile materials, such as biological materials, resulting in the nondestructive character of the technique (Greene et al. 1992).

For the *Ectatomma brunneum* ant species Smith 1858, there are still few studies about its biological characteristics despite its wide occurrence. This species has a vast distribution in Latin America, occurring from Panama to Argentina (Brown 1958), including Brazil, and is generally located in open areas, such as forest edges or glades, crops, pastures and secondary forests (Kempf 1972). The nest architecture of this species is not complex, with underground tunnels and chambers (Lapola et al. 2003). Just as for other predatory ants, the diet of *E. brunneum* is based mainly on proteins and carbohydrates (Porter 1989; Evans and Pierce 1995), and its protein is generally derived from terrestrial arthropods (Overall 1986; Giannotti and Machado 1992; Marques et al. 1995). In ants, sugar is used mainly as an energy source for adult workers, and protein is mainly designated for egg development and larvae growth (Brian 1983).

In this context, the effects of environmental factors on the composition of cuticular chemical, especially in ants, is a subject that still requires exploration. Therefore, in this work, the role effect of diet on the cuticular chemical composition in the *E. brunneum* ant species was evaluated by using GC and FTIR-PAS. To the best of our knowledge, this was the first time that the latter method was used for this type of analysis; it was compared to the standard GC technique so that its effectiveness could also be confirmed.

MATERIALS AND METHODS

Material Analysis. Four colonies of *E. brunneum* were collected, three of which were nested near the campus of the Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (22°11'53.32" S and 54°55'50.90" W) in an area with a predominance of grasses and shrubs, and the fourth colony was located a few meters from a semideciduous area (22°12'45.78"S and 54°54'43.15" W), according to the classification system of the Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (Veloso et al. 1991). Both locations are in the edges of rural areas. Sampling was performed in December of 2012 and February, March and April of 2013.

Immediately after each collection, approximately 15 workers were separated, anesthetized and sacrificed by freezing to serve as a control sample that had only eaten a natural diet. The remaining individuals from the colony were transferred to the laboratory and placed into artificial nests for the control of the physical conditions and their feeding. The nests were attached to an area of individual foraging for each colony, in which there was water and honey available daily and, on alternate days, larvae at the last stage of *Tenebrio molitor*. The number of larvae provided was related to the number of the individuals in the colony.

Due to the absence in the literature of a specific period needed to establish any effect over the cuticular chemical composition, colonies were kept under controlled conditions for 30 days until the first analysis. The number of individuals used to each analysis ranged from 9-15, according to the size of the population, to avoid compromising the maintenance of the colony until the end of the experiment. Sampling was also performed and analyzed at 60 days. All individuals were processed like the control

specimens, which means that, as soon as they were collected, they were anesthetized, sacrificed and preserved by freezing.

Analyses were performed in the gaster, which was extracted by microsurgical tweezers and scissors. This region was chosen because it has the greatest concentration of CHs in the insects (Cuvillier-Hot et al. 2001).

To evaluate if the compounds from the diet were present in the cuticle of the individuals under a controlled diet, both the honey and the *T. molitor* larvae were also evaluated. Therefore, 30 final-stage larvae of *T. molitor*, after being anesthetized and sacrificed by low temperature action, were separated in the same proportion for use by the two analytical tools, FTIR-PAS and GC. Six samples of the same honey used during the experiment were separated for analysis.

Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy (FTIR-PAS). For FTIR-PAS, the gaster and the *T. molitor* larvae were submitted to a drying process in vacuum desiccator for 48 h to reduce the water content, which can interfere in the infrared analyses. There was no preparation for the honey reading.

FTIR-PAS was performed using a Thermo Nicolet Nexus 670 spectrophotometer in the spectral region of 4000-400 cm^{-1} , which covers the well-known region called as “fingerprint region” (1500 and 400 cm^{-1}). During the experiment, the spectrometer was purged with dry compressed air to remove any water vapor and CO_2 . The photoacoustic cell was purged with helium gas before each reading. Carbon black was used as a reference to collect the spectrum of the infrared source. New reference spectra were performed every 100 minutes. The sample spectra were obtained with an average of 128 scans of the sample and with a resolution of 16 cm^{-1} .

Gas chromatography with flaming ionization detection (GC-FID). The CHs were extracted from the gaster with 5 ml of hexane (HPLC – VETEC) in an ultrasonic bath for 3 min. After filtration, the solvent was eliminated in an exhaust chamber, and the dry extract was dissolved in 100 μL of hexane for GC-FID analyses.

The GC-FID (Focus, GC, Thermo Scientific – San Jose, USA) was equipped with a capillary column OV-5 from the maker Ohio (Ohio, USA), that was composed by 5% phenyl dimethyl polysiloxane, with the dimensions of 30 m long x 0.25 mm diameter x 0.25 μm thickness of film. Nitrogen was used as loader gas at a constant pressure of 0.8

Bar. Analyses were performed in splitless mode with injection of 1 μL . The injector and detector temperature was adjusted at 300°C. The oven temperature was as follows: the heating was ramped from 50 to 85°C at a speed of 5°Cmin⁻¹; then, the temperature was increased at a speed of 8°Cmin⁻¹ until it reached 280°C; and finally, it was ramped with a speed of 10°Cmin⁻¹ until it reached 300°C, at which temperature it was held for 35 min. Chromatograms were recorded by the GC Solution software. Chemicals were identified based in the pattern of linear hydrocarbons of C₂₀ to C₃₁ (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in hexane) by comparison of the retention times.

Gas Chromatography - Mass Spectrometer (GC-MS). To evaluate the relationship between the food types, the chemical compounds of honey and *T. molitor* were extracted in 5 ml of hexane (HPLC – VETEC) in an ultrasonic bath for 60 min. After filtration, the supernatants were eliminated in an exhaust chamber, and the dry extracts were dissolved in 100 μL of hexane for GC-MS analysis.

GC-MS analyzes were performed in a gas chromatography (GC-17, Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with mass spectrometer detector (QP 5050). It was used a capillary column of fused silica DB-5 (J & W, 5% phenyl dimethyl polysiloxane), with 30 m long x 0.25 mm diameter x 0.25 μm thickness of film, under the following conditions: helium bearer gas (99.999% and flow speed of 1.0 mLmin⁻¹); 1 μL injection volume; split ratio of (1:20), with an initial oven temperature of 50°C, keeping it for 30 min in this temperature; and then, the temperature is increased to 85°C at 5°Cmin⁻¹; after that, it is raising to 280°C at 3°C min⁻¹, keeping it for 30 min in this temperature; the injector temperature was 250°C and the temperatures of the quadrupole detector and the transfer line were 280°C. The MS scan parameters included electron impact ionization voltage at 70 eV, a mass range from 45 to 600 m/z and a scan time interval of 0.5 s. The identifications were performed by comparing the mass spectra obtained in the QP5050 Libraries (NIST 2.0) and literature data (Adams, 2001). To the linear alkanes, these also were confirmed by the use of a standard mixture of C₈ a C₃₁ (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in hexane) by comparison of the retention times.

Statistical analysis. The possible variations among the control and the diet-controlled groups were studied by a discriminant function analysis (DFA), separating as variables the infrared absorption intensities and the corresponding wavenumbers of the photoacoustic spectrum, and the relative area of the selected alkanes in the GC-FID. This statistical method finds a linear combination of the variables that better explains the

differences among the analyzed groups. The distance squared of Mahalanobis was used to perceive changes between the control and the two different periods of the maintenance under a controlled diet.

RESULTS

The infrared absorption spectra obtained by FTIR-PAS for the control samples and the controlled-diet of 30 and 60 days groups, are shown in Figure 1 for the colony #1. Fifteen functional groups of the greatest relevance in the range from 3625 to 500 cm^{-1} were separated and identified, which are mainly related to the HCs and the protein. These peaks are listed in Table 1 with their corresponding wavenumbers and respective vibrational modes, identified from the data reported at literature (Smith 1999; Lin-Vien et al. 1991). The visual identification of distinctions among the spectra is not always possible; therefore, the absorption intensities were used in the construction of a matrix to evaluate if there is statistically significant differences among them.

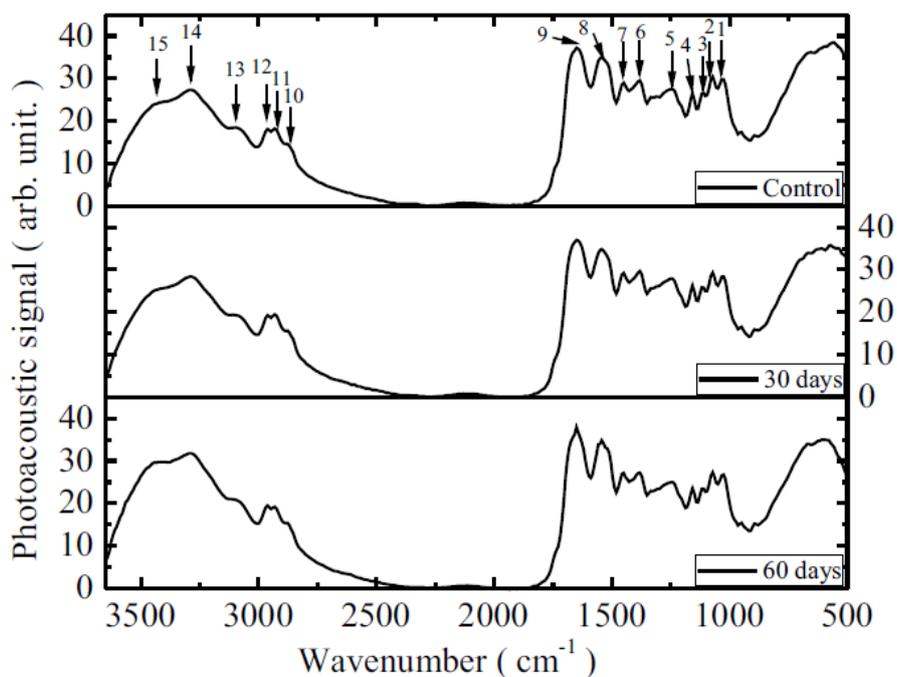


Fig. 1 Average infrared absorption spectra of gasters from ants of colony #1 generated by FTIR-PAS. The upper is for the control samples, the middle represents the samples after 30

days in the lab, and the lower is for the 60 days under a controlled diet. The arrows indicate the 15 peaks of greater relevancy that were separated for the statistical analyzes.

Table 1. Relationship of the 15 main functional groups and their respective vibrational modes selected for the statistical analysis.

Peak	Wavenumber (cm ⁻¹)	Functional group	Vibration mode
1	1041	C-H	Bending in the plane
2	1079	C-H	Bending in the plane
3	1110	C-H	Bending in the plane
4	1157	C-H	Bending in the plane
5	1241	CH ₃ -CO	Symmetric stretching
6	1396	CH ₃	Symmetric deformation
7	1457	CH ₃	Asymmetric stretching
		CH ₂	Deformation
8	1542	NH and/or CN (Amida II)	Twist in the plane and/or Asymmetric stretching
9	1650	C=C <i>cis</i> alkenes and/or C=N (Amida I)	Stretching
10	2877	CH ₃	Symmetric stretching
11	2931	CH ₂	Asymmetric stretching
12	2962	CH ₃	Asymmetric stretching
13	3093	-N-H	Overtone bending
14	3293	-N-H	Stretching
15	3425	-N-H	Stretching

The results obtained by the statistical analysis shows that there is a clear distinction between the control group and the controlled-diet groups (*Wilk's lambda* = 0.006, *F*= 22.135 and *p* <0.001); this is shown in the scatterplot in Figure 2. The first canonical root explained 88% of this distinction, and the peak that most contributed to this observation is the 3425 cm⁻¹.

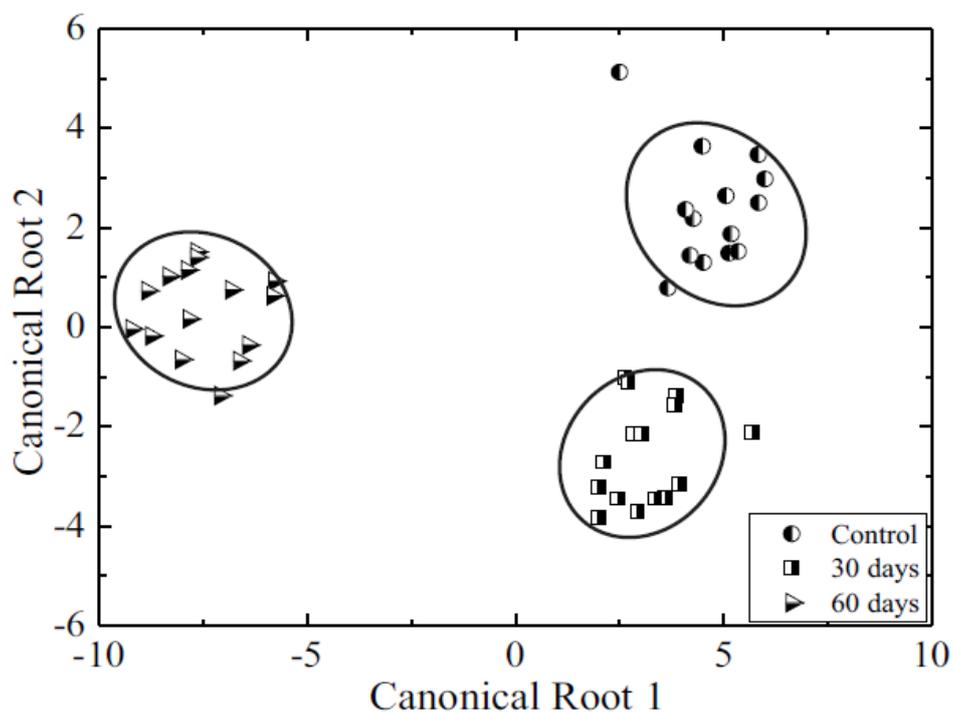


Fig. 2 Scatterplot of the control, 30- and 60-days controlled-diet groups, for colony #1, from analysis of the 15 selected peaks in the infrared spectra.

Chromatography analyses were performed in the same samples from colony #1 described above, and the linear HCs of alkanes from C_{20} to C_{31} were observed as listed in Table 2 with the correspondent retention time used for the analysis. Values of the relative areas of the HCs were used as variables for DFA. The results generated by GC-FID enforce those found by FTIR-PAS (*Wilks's lambda* < 0.001, $F=513.460$ and $p < 0.001$), as can be seen by the clear separation between the scatterplot shown in Figure 3, with the first canonical root explaining 89% of the difference. According to this analysis, the most important alkanes for the separation of groups were C_{20} , C_{23} , C_{25} and C_{27} . The presence of the same alkanes can also be seen in the chromatography analysis of diet, and these are among the alkanes with a higher relative percentage, according to Table 3. In addition to the alkanes, other volatile compounds, such as phytol that is specifically associated with honey and aldehydes related to the aroma, were also found in the reading of dietary items.

Table 2. Retention time by GC-FID of hydrocarbons analyzed in colony #1.

Alkane	Nomenclature	Retention time (min)
C ₂₁	n-heneicosane	29.32
C ₂₂	n-docosane	30.47
C ₂₃	n-tricosane	31.73
C ₂₄	n-tetracosane	32.79
C ₂₅	n-pentacosane	33.93
C ₂₆	n-hexacosane	34.96
C ₂₇	n-heptacosane	36.18
C ₂₈	n-octacosane	37.52
C ₂₉	n-nonacosane	39.08
C ₃₀	n-triacontane	40.87
C ₃₁	n-hentriacontane	43.01

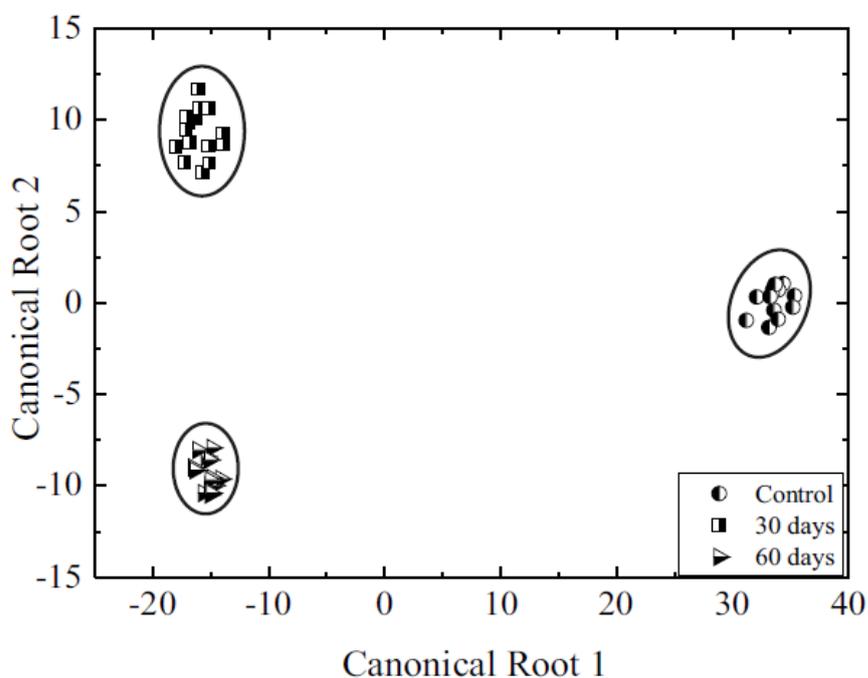


Fig. 3 Scatterplot of the control, 30- and 60-days controlled-diet groups, for colony #1, from analysis of the main HCs peaks identified by GC-FID.

Table 3. Compounds present in the diets of *T. molitor* and honey and their relative proportions.

	Compounds	Concentration (%)	
		<i>Tenébrio molitor</i>	Honey
C ₁₈	n-octadecane	1.4	-
	Pentadecanal	-	0.4
C ₁₉	n-nonadecane	1.7	1.7
	Octadecanal	3.2	-
C ₂₀	n-eicosane	0.7	0.12
C ₂₁	n-heneicosane	-	1.6
C ₂₂	n-docosane	73.6	2.1
	Phytol	-	1.3
	Nonadecanal	-	4.5
C ₂₃	n-tricosane	-	5.7
C ₂₄	n-tetracosane	9.9	0.2
C ₂₅	n-pentacosane	2.9	9.1
C ₂₆	n-hexacosane	2.5	0.11
C ₂₇	n-heptacosane	0.1	47.8
C ₂₉	n-nonacosane	0.11	21.4
C ₃₀	n-triacontane	0.1	0.1
C ₃₁	n-hentriacontane	0.12	0.1

The obtained results with both techniques for colony #1 show that the chemical profile has changed as time passed up to 60 days of the controlled diet. Additionally, the statistical analysis indicates a very good agreement in the explanation of the first canonical roots in both techniques. Therefore, to interpret the following experimental data for the four colonies, as well the diet of *T. molitor* and honey, only the FTIR-PAS technique will be used.

For the next samples, the same 15 peaks described earlier were selected for statistical analysis (Table 1). The infrared absorption spectra generated for each group, the control and the 30- and 60-day controlled-diet groups for colonies #2, #3 and #4, did not

show a clear visual difference between the peak intensities. However, the statistical analysis was performed to verify possible differences between control and controlled diet samples. For this analysis, all control samples from colonies #1, #2, #3 and #4 were considered as a unique control group, and the same for samples with 30 and 60 days in controlled diet, which were called 30 days and 60 days groups, respectively. The purpose in consider all samples together is to avoid any possible genetic and environmental contributions in the results. The obtained statistical result can be seen in Figure 4, which shows significant differences among the groups (*Wilks's lambda* = 0.337, *F* = 6.972 e *p* < 0.001). The first canonical root explained 86% of the difference. This analysis indicated that eight vibrational modes were responsible for the separation of the control, 30 and 460 days groups (Table 4). Again, the results show that, in the first 30 days under a controlled diet, there are changes in the cuticle chemical profile, and the difference in relation to the control is accentuated after 60 days (Fig. 4). Table 5 shows that the squared Mahalanobis distance became higher between the control and the time under controlled feeding, a pattern that also occurs with the *F* values shown in Table 6.

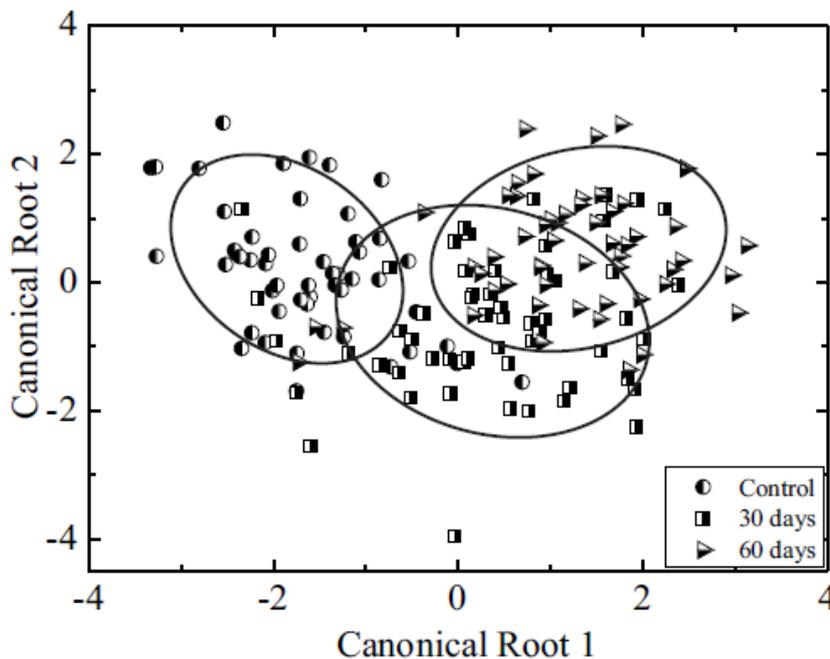


Fig. 4 Scatterplot of the control, 30- and 60-days controlled–diet groups, generated from the union of the four colonies of *Ectatomma brunneum*, from analysis of the 15 selected peaks in the infrared spectra.

Table 4. Results of the DFA from the variables and the more significant peaks (featured) of the cuticular chemical composition profile obtained for the FTIR-PAS of the four colonies, including the control and the controlled-diet groups (30 and 60 days).

Peak	Wavenumber (cm ⁻¹)	Wilks's Lambda	F	p	Root 1	Root 2
1	1041	0.34	0.43	0.649	0.55	-0.04
2	1079	0.36	4.30	0.015	-2.10	0.45
3	1110	0.34	1.43	0.242	0.49	-1.18
4	1157	0.34	1.54	0.217	-0.23	-1.37
5	1241	0.36	4.18	0.017	0.88	0.22
6	1369	0.33	0.21	0.804	-0.04	0.29
7	1457	0.35	1.88	0.156	-0.41	-0.86
8	1542	0.35	3.68	0.028	-1.44	-0.34
9	1650	0.36	5.67	0.004	1.57	0.56
10	2877	0.36	4.93	0.008	1.86	-0.27
11	2931	0.34	0.89	0.410	-0.09	1.51
12	2962	0.34	1.03	0.359	-0.67	-1.02
13	3093	0.35	4.64	0.011	-0.31	-1.88
14	3293	0.41	15.71	<0.001	-2.67	0.49
15	3425	0.44	21.40	<0.001	2.55	-0.09

Table 5. Squared Mahalanobis distances between the control and controlled-diet group (30 and 60 days) for the four colonies.

Groups	Control	30 days	60 days
Control	0.00	4.75	8.09
30 days	4.75	0.00	1.88
60 days	8.09	1.88	0.00

Table 6. F value for the control and controlled-diet groups (30 and 60 days) for the four colonies.

Groups	Control	30 days	60 days
Control		7.79	13.03
30 days	7.79		3.14
60 days	13.03	3.14	

The average infrared absorption spectra of foods and the control groups are presented in Figure 5 to improve the visualization and comparison. The gaster spectra for the ants under a controlled diet (for 30 and 60 days) were not shown because, visually, they are similar to the control group. From the analysis we can observe that even the functional groups in which there are higher or lower absorptions for the foods, some exist that stand out as the more significant groups for the separation among the groups, which elucidates the interference of diet in the variation observed.

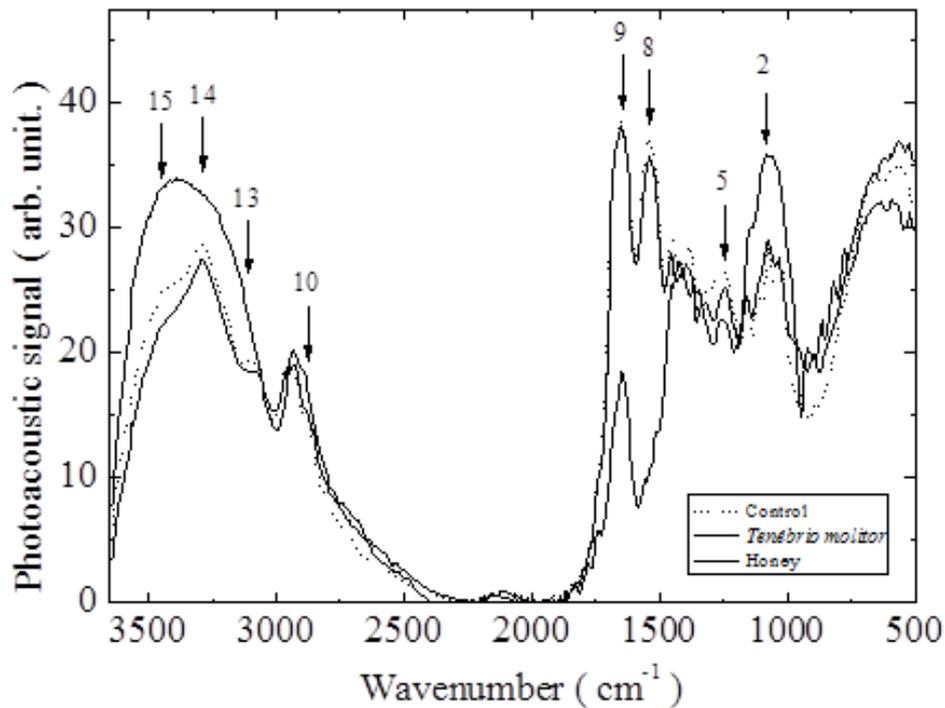


Fig. 5 The average infrared absorption spectra from the union of the four colonies of *Ectatomma brunneum* for the control, 30- and 60-days controlled-diet groups, and for the food used in the lab for the ants: honey and *Tenebrio molitor*.

DISCUSSION

The outcomes for both techniques, GC-FID and FTIR-PAS, supported by the statistical analyses used in the study of the chemical composition of the gaster from colony #1, show that the external factors have a significant influence on the chemical signature changes of the individuals under feeding control, in comparison to the ones exposed only to a natural diet.

As well the results found for colony #1 by chromatography, Zweden and collaborators (2009) reported changes in the alkanes C₂₅ and C₂₇ in studies with the species *Camponotus aethiops* kept on the same diet of larva of *T. molitor* and honey. According to these authors, the HCs of *T. molitor* are characterized, mainly, by three linear alkanes, C₂₅, C₂₇ and C₂₉, but Bursell and Clements (1967) described the importance of an additional alkane, C₃₁. These results deviate from the results in this paper with the larvae of *T. molitor*, which showed the highest relative percentage in the alkanes C₂₂, C₂₄, C₂₅ and C₂₆. This variation is possibly due to the analyses covering the internal and external compounds of the sample, which are different from the results published by Zweden et al. (2009) and Bursell and Clements (1967), who analyzed only the larvae cuticles. These results help to explain some of the differences found in the greater influence of alkanes because it is only about the HCs of *T. molitor*.

Graddon et al. (1979), in a chromatography analysis with honey, detected nearly 160 volatile compounds present in this food. Among these compounds, they found alkanes from C₂₃ to C₃₁, which the authors assigned as being derived from wax. This characteristic, probably, also occurred in the reading of honey used as part of the diet of the colonies under controlled feeding.

Comparing the literature and the results among the group variations under a natural and a controlled diet, the chromatography results showed that, among the higher significance of alkanes for groups separation in statistics (C₂₀, C₂₃, C₂₅ and C₂₇), only the C₂₀ was not among the higher concentration of alkanes in honey (C₂₃, C₂₅, C₂₇ e C₂₉); whereas in the larvae, only the alkane C₂₅ is among the prominent alkenes, as can be observed in Table 3. Compared to *T. molitor*, the honey shows a higher interference in these variations.

The results of the chemical composition analyzed for the four together colonies of ants, for the control group and under a controlled diet, show the clear interference of

external factors with this pheromone, beginning immediately after the first 30 days. The same pattern, with a rapid initial alteration of the chemical profile, was also found in another study involving the chemical signature in social insect species imposed to alteration of environment, mainly diet alteration (Lenoir et al. 1999; Liang and Silverman 2000; Sorvari et al. 2008; Zweden et al. 2009). This phenomenon can be in part explained by the process of trophallaxis and allogrooming. This behavior should accelerate a rapid distribution of new substances among the members of the colony, turning them into a part of the recognition system (Crozier and Dix 1979; Lenoir et al. 1999; Soroker et al. 2003).

As can be seen in Figure 4, the dispersion among the ellipsis of the three evaluated groups was lower compared to the scatterplot generated by the statistical analysis with only colony #1 (Figure 2). This characteristic occurred probably due to the genetic variations and environmental differences present among the four colonies. This response shows that, even with a genetic influence, the groups are identified according to their exogenous influences, which are a natural diet or 30 or 60 days on a controlled diet.

Different papers report that the cuticular chemical profiles change with the time, according to the seasonality changes, material variation for nest construction, and especially, diet alterations (Vander Meer et al. 1989; Provost et al. 1993; Nielsen et al. 1999; Liu et al. 2001; Lahav et al. 2001; Steinmetz and Schmolz 2005). Regarding these changes, it is relevant to note that the results shown here are from colonies kept under similar and constant physical conditions. Therefore, it is likely that the variations found are consequences of the diet alteration.

Results published by Lenoir and collaborators (2001) enforce the hypothesis of the importance of exogenous factors in the odor profile of the colony. The author reports that newly emerged workers have a cuticular profile different from the rest of the colony, but that these differences are diluted over time, as social interactions occur. Thus, these results show that the external factors aggregate to the genetic ones in the construction of the colonial chemical signature, as observed in this paper.

In Fig. 5, the most relevant peaks obtained by statistical analysis to differentiate between the control group and the controlled groups are indicated. The *T. molitor* and the honey spectra are dissimilar, but the *T. molitor* spectrum is similar to the control group spectrum. Among the most relevant peaks in Fig. 5, as indicated by statistical analysis, peaks 2, 8, 9, 14 and 15 are the most different from the control spectrum. From these, the

peak 15 was indicated as the most important for the first canonical root, indicating that the honey is the diet element that most significantly contributes to the chemical changes in the gasters of *E. brunneum*.

Statistical analyses from FTIR-PAS were very similar to the results obtained by chromatography, from which it was observed that the alkanes present in the carbohydrates diet possibly had a higher influence on the most significant cuticular chemical composition for the differentiation between the groups. This characteristic supports the reported data by Brian (1983), which show that sugar is the main source of energy for the adult workers, and the proteic items are utilized for the development of the immature. Similar results, in which diet was shown as a decisive factor in the construction of the surface pheromone composition, were found by Liang and Silverman (2000), who kept two groups of colonies of the *Linepithema humile* ant species in a laboratory for 56 days under various proteic diets of *Blattella germanica* and *Supella longipalpa*. The results show that the diet compounds change the chemical signature, and the compounds present in the two species showed the same change in their cuticular chemical profiles. Sorvari et al. (2008) showed complementary information for the *Formica aquilonia* ant species, in which, in addition to the composition, the amount of food also interfered with the chemical signature of the colonies and, consequently, with the intracolony recognition ability. It should be noted that the quality, not the quantity, may have been decisive for the variations because the colonies under artificial conditions were all kept under similar conditions.

The results confirm data from the literature showing that, for various ant species, the exogenous factors, especially the diet, are determining factors in the cuticular chemical composition. Therefore, genetic factors may not be the only factors responsible for composing the chemical signature of a species; when the variations in the environment become homogenized, the recognition signals do also, and the diet was shown to have a major role in this process. In addition, these results reinforce the reliability of the FTIR-PAS technique as an analytical tool for biological systems that is worthy of further application because of its agility and reproducibility.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Agência Brasileira de Inovação (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for their financial support.

REFERENCES

Adams RP (2001) Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA

Almeida FS, Lima SM, Andrade LHC, Suárez YR (2012) Differentiation of Neotropical fish species with statistical analysis of Fourier Transform Infrared Photoacoustic. *Appl Spectrosc* 66:782-785. doi: 10.1366/11-06487

Andrade LHC, Freitas PG, Mantovani BG, Figueiredo MS, Lima SM, Rangel MAS, Mussury, RM (2008) Detection of soybean rust contamination in soy leaves by FTIR photoacoustic spectroscopy. *Eur Phys J - Special Topics* 153:539-541. doi: 10.1140/epjst/e2008-00503-8

Antonialli- Junior WF, Lima SM, Andrade LHC, Suárez YR (2007) Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genetics Mol Res* 6:492-499

Antonialli- Junior WF, Suarez YR, Izida T, Andrade LHC, Lima SM (2008) Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (2008) *Genetics Mol Res* 7:559–566

Billen J, Morgan ED (1998) Pheromone communication in social insects – sources and secretions. In: Vander Meer RK, Breed MD, Espelie KE, Winston ML (ed) *Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites*. Boulder, Colorado: Westview Press, pp 3-33

- Billen J (2004) Morphology of exocrine glands in social insects with special emphasis on the contributions by Italian researchers. *Insect Soc Life* 5:69-75
- Bonavita-Cougourdan A, Clement JL, Lange C (1987) Nestmate recognition: the role of cuticular hydrocarbons in the ant *Camponotus vagus* Scop. *J Entomol Sci* 22:1–10
- Brian MV (1983) *Social Insects, Ecology and Behavioral Biology*. Chapman and Hall, London
- Brown Junior WR (1958) Contributions toward a reclassification of the Formicidae. II Tribe Ectatomminae (Hymenoptera). *Bull Mus of Comp Zool Harvard* 118:175-362
- Bursell E, Clements AN (1967) The cuticular lipids of the larva of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera). *J Insect Physiol* 13:1671-1678
- Crozier RH, Dix MW (1979) Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social Hymenoptera. *Behav Ecol and Sociobiol* 4:217-224. doi: 10.1007/BF00297645
- Cuvillier-Hot V, Cobb M, Malosse C, Peeters C (2001) Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *J Insect Physiol* 47: 485-493. doi: 10.1016/S0022-1910(00)00137-2
- Du C, Zhou J, Wang H, Chen X, Zhu A, Zhang J (2009) Determination of soil properties using Fourier transform mid-infrared photoacoustic spectroscopy. *Vib Spectrosc* 49:32-37. doi: 10.1016/j.vibspec.2008.04.009
- Du C, Guiqin Z, Jianmin Z, Huoyan W, Xiaoqin C, Yuanhua D, Hui W (2010) Characterization of animal manures using mid-infrared photoacoustic spectroscopy. *Bioresour Technol* 101:6273-6277. doi: 10.1016/j.biortech.2010.03.010

Evans JD, Pierce NE (1995) Effects of diet quality and queen number on growth in Leptothoracine ant colonies (Hymenoptera: Formicidae). *J New York Entomol Soc* 103:91-99

Gamboa GJ (1986) The evolution and ontogeny of nestmate recognition in social wasps. *Ann Rev Entomol* 31:431-454. doi: 10.1146/annurev.en.31.010186.002243

Giannotti E, Machado VLL (1992) Notes on the foraging of two species of Ponerinae ants: Food and resources and daily hunting activities (Hymenoptera: Formicidae). *Bioikos*, 6:7-17

Gordillo-Delgado F, Marín E, Cortés-Hernández M, Mejía-Morales C, García-Salcedo AJ (2012) Discrimination of organic coffee via Fourier transform infrared-photoacoustic spectroscopy. *J Sci Food Agric* 92:2316-2319. doi: 10.1002/jsfa.5628

Graddon AD, Morrison JD, Smith JF (1979) Volatile constituents of some unifloral Australian honeys. *J Agric Food Chem* 27:832-837. doi: 10.1021/jf60224a046

Greene RV, Gordon SH, Jackson MA, Bennett GA (1992) Detection of fungal contamination in corn: potential of PAS-FTIR and DRS. *J Agric Food Chem* 40:1144-1149. doi: 10.1021/jf00019a011

Hofman M, Pasiieczna-Patkowska S, Ryczkowski J, Wachowski L (2008) Identification of functional group on the surface of modified organic materials using the FT-IR/PAS method. *Eur Phys J Special Topics* 15:325-328. doi: 10.1140/epjst/e2008-00569-2

Hölldobler B, Wilson EO (1990) *The Ants*. Cambridge: Belknap Press

Jutsum AR, Saunders TS, Cherrett JM (1979) Intraspecific aggression in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Anim Behav* 27:839-844, 1979

Kempf WW (1972) Catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). *Stud Entomol* 15:1-344

Lahav S, Soroker V, Hefetz A, Vander Meer RK (1999) Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwissenschaften* 86:246-249. doi: 10.1007/s001140050609

Lahav S, Soroker V, Vander Meer RK, Hefetz A (2001) Segregation of colony odor in the desert ant *Cataglyphis niger*. *J Chem Ecol* 27:927- 943. doi: 10.1023/A:1010382919227

Lapola DM, Antonialli-Junior WF, Giannotti E (2003) Arquitetura de ninhos da formiga neotropical *Ectatomma brunneum* F. Smith, 1858 (Formicidae, Ponerinae) em ambientes alterados. *Rev Bras Zool* 5:177-188

Le Moli F, Mori A, Grasso Da (1992) Nestmate and conspecific non nestmate recognition in *Formica cunicularia* Latr.: the effect of diet differences. In: Billen J (ed) *Biology and evolution of social insects*. Leuven, Belgium: Leuven University Press pp161–165

Lenoir A, Fresneau D, Errard C, Hefetz A (1999) Individuality and colonial identity in ants. In: Detrain C, Deneubourg JL, Pasteels J (ed) *Information Processing in Social Insects*. Basel, Switzerland: Birkhauser-Verlag pp 219-237

Lenoir A, Cuisset D, Hefetz A (2001) Effects of social isolation on hydrocarbon pattern and nestmate recognition in the ant *Aphaenogaster senilis* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Soc* 48:101-109. doi: 10.1007/PL00001751

Liénard MA, Strandh M, Hedenstrom E, Johansson J, Lofstedt C (2008) Key biosynthetic gene subfamily recruited for pheromone production prior to the extensive radiation of Lepidoptera. *BioMed Central* 8:1-15. doi:10.1186/1471-2148-8-270

Liang D, Silverman J (2000) “You are what you eat”: Diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften* 897:412-416. doi: 10.1007/s001140050752

Lima SM, Izida T, Figueiredo MS, Andrade LHC, Del Ré PV, Jorege N, Buba E, Aristone F (2008) Analysis of biodiesel and frying vegetable oils by means of FTIR photoacoustic spectroscopy. *Eur Phys J Special Topics* 153:535-537. doi: 10.1140/epjst/e2008-00502-9

Lin-Vien D, Colthup NB, Fateley WG, Grasselli JG (1991) *Infrared And Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. Academic Press, San Diego New York Boston London Sydney Tokyo Toronto

Liu ZB, Bagnères AG, Yamane S, Wang QC, Kojima J (2001) Intra-colony, inter-colony and seasonal variations of cuticular hydrocarbon profiles in *Formica japonica* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Soc* 48:342-346. doi: 10.1007/PL00001787

Marques OM, Viana CHP, Kamoshida M, Carvalho CAL, Santos GMM (1995) Hábitos de nidificação e alimentares de *Ectatomma quadridens* (Fabricius, 1793) (Hymenoptera, Formicidae) em Cruz das Almas – Bahia. *Insecta* 4:1-9

Martin S, Drijfhout F (2009) A Review of Ant Cuticular Hydrocarbons. *J Chem Ecol* 35:1151-1161. doi: 10.1007/s10886-009-9695-4

Neves EF, Andrade LHC, Suarez YR, Lima SM, Antonialli-Junior WF (2012) Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genetics Mol Res* 11:1891-1898. doi: 10.4238/2012.July.19.8

Neves EF, Montagna TS, Andrade LHC, Suárez YR, Lima SM, Antonialli-Junior WF (2013) Social parasitism and dynamics of cuticular hydrocarbons in paper wasp of the *Mischocyttarus*. *J Kansas Entomol Soc* 86:69-77. doi: 10.2317/JKES1207610.1

Nielsen J, Boomsma JJ, Oldham NJ, Petersen HC, Morgan ED (1999) Colony-level and season-specific variation in cuticular hydrocarbon profiles of individual workers in the ant *Formica truncorum*. *Insectes Soc* 46:58-65. doi: 10.1007/s000400050113

Overall WL (1986) Recrutamento e divisão de trabalho em colônias naturais da formiga *Ectatomma quadridens* (Fabr.) (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). Bol Mus Para Emílio Goeldi (Zool) 2:113-135

Porter SD (1989) Effects of diet on the growth of laboratory fire ant colonies (Hymenoptera: Formicidae). J Kansas Entomol Soc 62:288-291

Provost E, Riviere G, Roux M, Morgan ED, Bagnères AG (1993) Change in the chemical signature of the ant *Leptothorax lichtensteini* bondroit with time. Insect Biochem Molec Biol 2:945-957

Richard FJ, Hefetz A, Christides JP, Errard C (2004) Food influence on colonial recognition and chemical signature between nestmates in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Chemoecol 16:9-16. doi: 10.1007/s00049-003-0251-3

Smith BC (1999) Infrared spectral interpretation: a systematic approach. Boca Raton, Florida: CRC Press

Silverman J, Liang D (2001) Colony disassociation following diet partitioning in a unicolonial ant. Naturwissenschaften 88:73-77. doi: 10.1007/s001140000198

Soroker V, Lucas C, Simon T, Fresneau D, Durand JL, Hefetz A (2003) Hydrocarbon distribution and colony odour homogenization in *Pachycondyla apicalis*. Insectes Soc 50:212-217. doi: 10.1007/s00040-003-0669-1

Sorvari J, Theodora P, Turillazzi S, Hakkarainen H, Sundsteöm L (2008) Food resources, chemical signaling, and nestmate recognition in the ant *Formica aquilonia*. Behav Ecol 19:441-447. doi:10.1093/beheco/arm160

Steinmetz I, Schmolz E (2005) Nest odor dynamics in the social wasp *Vespula vulgaris*. Naturwissenschaften 92:414-418. doi: 10.1007/s00114-005-0006-9

Vander Meer RK, Saliwanchik D, Lavine B (1989) Temporal changes in colony cuticular hydrocarbon patterns of *Solenopsis invicta*. Implications for nestmate recognition. *J Chem Ecol* 15:2115-2125

Veloso HP, Rangel Filho ALR, Lima JCA (1991) Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais

Zweden JSV, Dreier S, D'Etorre P (2009) Disentangling environmental and heritable nestmate recognition cues in a carpenter ant. *J Insect Physiol* 55:158-163. doi:10.1016/j.jinsphys.2008.11.001

CAPÍTULO 5. VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO VENENO DA FORMIGA *Ectatomma brunneum* (FORMICIDAE: ECTATOMMINAE) ANALISADOS PELA TÉCNICA DE FTIR-PAS

Neste capítulo é apresentado um artigo referente à segunda parte da dissertação, a qual avaliou a influência do ambiente sobre a composição do veneno da espécie *Ectatomma brunneum* de quatro locais ambientalmente distintos. Neste trabalho, a espectroscopia fotoacústica no infravermelho médio por transformada de Fourier foi aplicada pela primeira vez para esse propósito. Os resultados de absorção infravermelha foram interpretados com análise estatística dos principais modos vibracionais observados nos espectros, os quais estão relacionados principalmente ao veneno. Esse artigo foi preparado nos moldes da revista *Journal of Chemical Ecology*, a qual está estratificada no Qualis A1 da área de Ciências Ambientais da CAPES, com Fator de Impacto de 2.462 (ano base 2012). Sua submissão ocorrerá no primeiro trimestre de 2014.

VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO VENENO DA FORMIGA *Ectatomma brunneum* (FORMICIDAE: ECTATOMMINAE) ANALISADOS PELA TÉCNICA DE FTIR-PAS

R. C. Bernardi¹; E. L. B. Firmino¹; A. Mendonça²; D. S. Antônio¹; L. C. Andrade¹; W. F. Antonialli-Junior¹; S. M. Lima¹.

¹ *Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, CEP 79804-970, C.P. 351, Dourados, MS, Brazil.*

² *Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados, CEP 79804-970, C.P. 332, Dourados, MS, Brazil.*

Resumo - O singular domínio dos insetos e de outros artrópodes terrestres pode ser atribuído, em parte, a grande diversidade de mecanismos de defesa químicos presentes em seus corpos. Quanto a mecanismo de proteção, as formigas ganham destaque já que estas apresentam em seus corpos uma grande quantidade de glândulas com função de defesa, entre elas a de veneno. Trabalhos desenvolvidos com animais peçonhentos mostram que os fatores ambientais, sobretudo a dieta, contribuem na construção da composição do veneno, gerando variações nos compostos, mesmo em uma única espécie. Uma vez que, outros trabalhos já demonstraram que fatores exógenos interferem significativamente na composição do veneno de animais peçonhentos e, que pouco se sabe sobre a variação da composição do veneno de formigas, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a variação intraespecífica do veneno de quatro populações em condições ambientalmente distintas da formiga *Ectatomma brunneum*, pela técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier, uma técnica ainda não explorada para este composto. Os resultados mostraram que houve uma diferença significativa entre as populações avaliadas, sendo que a dieta, possivelmente, foi determinante nestas variações. Além disso, a FTIR-PAS se mostrou uma ferramenta bastante útil, principalmente para se somar a técnicas que possam auxiliar nas pesquisas com veneno.

Palavras-chave – Peçonha, Ectatomminae, Hymenoptera, FTIR-PAS, Aparelho de Ferrão.

INTRODUÇÃO

O singular domínio dos insetos e de outros artrópodes terrestres pode ser atribuído, em parte, a grande diversidade de mecanismos de defesa químicos presentes em seus corpos. Além das secreções glandulares defensivas, alguns artrópodes desenvolveram um sofisticado sistema de armas químicas, entre eles o desenvolvimento de um mecanismo de injeção e produção de veneno, que representaram atributos evolucionários que contribuíram para o seu sucesso evolutivo (Whitman et al. 1990).

O ferrão, presente em parte das espécies da ordem Hymenoptera, se desenvolveu a partir de uma modificação do aparelho ovopositor (Maclintal e Starr 1996). Particularmente nesta ordem, as diversas espécies evoluíram seus aparatos de defesa

conforme sua biologia e comportamento, sendo o ambiente, com suas variações climáticas e com diferentes tipos de fontes alimentares, um fator determinante neste processo (Whitman et al 1990).

Ao que se refere à produção de aparatos de defesa, as formigas podem ser comparadas a uma fábrica de materiais químicos, uma vez que estas apresentam distribuídas pelo seu corpo um sistema de mais de cinquenta glândulas exócrinas diferentes (Billen 2004). Devido a sua abundância, facilidade de manutenção das colônias em laboratório e a variedade de comportamentos, as formigas se tornaram o principal sistema para o estudo dos aparatos químicos entre os insetos sociais (Martin e Dryjfhout 2009).

Em formigas, o veneno desempenha de três funções principais, defesa contra predadores, captura de presas e comunicação social (Schmidt, 1986), com a função ofensiva, sem dúvida, desempenhando o papel mais importante em espécies de formigas predadoras (Aird e Silva 1991; Cogo et al. 1993; Daltry et al. 1996). O veneno das formigas, bem como em outros Himenópteros é constituído basicamente de complexos de moléculas orgânicas, proteínas, peptídeos, lipídeos, aminas vasoativas (norepinefrina, histamina e dopamina) e algumas enzimas como fosfolipases, hialuronidases e fosfatases (Edstrom 1992; Lima e Brochetto-Braga 2003), mas pode ser descrito como predominantemente constituído por proteínas e peptídeos, ou como uma mistura complexa de compostos de baixa massa molecular (Palma 2006).

Trabalhos desenvolvidos com animais peçonhentos mostram que os fatores ambientais contribuem na construção da composição do veneno, gerando variações nos compostos, mesmo em uma única espécie. Esta interferência do meio externo proporciona diferenciação na toxicidade, na concentração e até na especificidade do veneno com determinados tipos de presas (Santoro et al. 1999; Orivel e Dejean 2001; Tsai et al. 2004; Badhe et al. 2006; Saporito et al. 2007), sendo também associadas a idade dos indivíduos, ao clima, a sazonalidade e a composição da dieta (Ferreira Jr. et al. 2010). A variação do veneno dentro das populações também pode ser explicada pela expressão diferenciada de um conjunto de genes, em resposta as diferentes condições ecológicas e ontogênicas a que estavam expostos (Tsai et al. 2004).

De fato, a evolução da composição do veneno foi estudada mais extensivamente em cobras. Em um trabalho realizado por Daltry (1996), foi relatado que a variação da composição do veneno entre populações da espécie de cobra *Calloselasma rhodostoma*,

esta ligada a dieta local, provavelmente reflexo da seleção natural de compostos eficazes para abater presas locais. Por outro lado, outros estudos também demonstraram que algumas espécies se especializaram no sequestro de substâncias do ambiente para compor e até potencializar seu sistema de defesa (Ruxton et al. 2004; Saporito et al. 2007).

Os fatores que interferem na composição do veneno e sua variação dentro de uma mesma espécie têm sido um ramo ativo nas pesquisas recentes. O interesse do estudo da variabilidade intraespecífica do veneno tem aumentado, principalmente, devido as graves consequências desta variação na eficácia de soros anti-veneno para humanos (Harrison et al. 2011; Casewell et al. 2013). Mais recentemente o veneno de animais, incluindo as espécies da ordem Hymenoptera, ganhou destaque em relação ao seu potencial farmacológico (Oren e Shai 1997; Yan e Adams 1998; Blaylock 2000; Orivel et al. 2001; Orivel e Dejean 2001; Zelezetsky et al. 2005 Koh et al. 2006; Son et al. 2007), sendo que este potencial, possivelmente, também pode sofrer interferência das variações do veneno destas espécies.

A espécie de formiga *Ectatomma brunneum* Smith 1858, apesar de sua ampla ocorrência, ainda pouco se sabe sobre os vários aspectos de sua biologia, sobretudo quanto ao seu veneno. Esta espécie tem uma vasta distribuição na América Latina, ocorrendo do Panamá até a Argentina (Brown 1958). Geralmente se localiza em áreas abertas, tais como bordas de florestas ou clareiras, culturas, pastagens e matas secundárias (Kempf 1972). Assim como outras formigas predadoras, a dieta de *E. brunneum* se baseia principalmente em proteínas e carboidratos (Porter 1989; Evans e Pierce 1995), sendo que sua fonte proteica em geral vem de artrópodes terrestres (Overal 1986; Giannotti e Machado 1992; Marques et al. 1995).

Ainda que o veneno de himenópteros sociais seja relatado desde o final do século XIX, o conhecimento da composição do veneno de formigas, e de fato, de toda ordem Hymenoptera, é ainda muito limitada, sendo que pouco se sabe a respeito da influência ambiental sobre estes compostos. Essa escassez de dados está relacionada, principalmente, a grande dificuldade de obtenção de uma quantidade suficiente de amostras de peçonha para realização dos estudos mais completos (Lima e Brocheto 2003; Favreau et al. 2006).

Os métodos mais usuais para avaliar a composição do veneno em formigas, são as análises Cromatográficas. No entanto, nos últimos anos, a técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS, *Fourier*

Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy) tem provado ser bastante confiável para leitura de compostos presentes em insetos sociais, como os Hidrocarbonetos Cuticulares (Antoniali Jr et al. 2007; Antoniali Jr et al. 2008; Neves et al. 2012; Neves et al. 2013), sendo que a efetividade da técnica também foi comprovada em trabalhos envolvendo outros animais, como no estudo com peixes (Almeida et al. 2012).

Devido à versatilidade da sua forma de detecção fotoacústica, que permite a análise de absorção óptica de materiais opacos na região do infravermelho, a FTIR-PAS pode ser aplicada em diferentes sistemas. A faixa de absorção do infravermelho médio é sensível às vibrações e rotações de grupos químicos moleculares e, sendo assim, é capaz de identificar e distinguir radicais moleculares e os tipos de ligações químicas envolvidas em determinada amostra, sendo este o aspecto mais vantajoso dessa técnica (Smith 1999). A radiação de baixa intensidade no qual este método opera, garante uma eficácia na leitura de materiais frágeis, como os materiais biológicos, permitindo que a técnica conserve a amostra, podendo posteriormente ser utilizada para análise em outros procedimentos (Greene et al. 1992). Um dos destaques da técnica, ante outros procedimentos, é a possibilidade de se trabalhar com uma quantidade reduzida de amostra.

Uma vez que, outros trabalhos já demonstraram que fatores ambientais interferem significativamente na composição do veneno de animais peçonhentos e, que pouco se sabe sobre a variação da composição de veneno de formigas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variação intraespecífica do veneno da formiga *E. brunneum*, pela técnica de FTIR-PAS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e material de análise. Foram coletadas operárias forrageadoras de 4 populações de *E. brunneum*, três destas de diferentes locais da região de Dourados – Mato Grosso do Sul, e uma de Ilhéus – Bahia, no período de setembro à outubro de 2013. Os pontos selecionados para coleta em Dourados foram uma área de mata semidecídua; na área urbana da cidade, afetada pela ação antrópica; e outra no campus da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, instalada na área rural da cidade, com predominância de gramíneas, espécies arbustivas, com edificações e circulação de pessoas, que foi chamada

neste trabalho como área intermediária. As coletas de Ilhéus foram realizadas em uma área de monocultura de Cacau, onde está localizado o CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira). Portanto os quatro locais de coleta apresentavam diferenças ambientais.

Todo o procedimento de captura dos indivíduos foi realizado por coleta ativa, de forma aleatória, de operárias em atividade de forrageamento. Em todas as áreas de coleta, buscou-se diversificar os locais de captura, a fim de obter uma maior representação da população local, aumentando a variação genética nas amostragens. De cada uma das áreas, foram recolhidos 75 indivíduos. Logo após as coletas, os indivíduos foram anestesiados, sacrificados e armazenados por congelamento, a fim de preservar as amostras.

A extração do reservatório de veneno ocorreu por dissecação, sendo que todos os filamentos glandulares livres e o ferrão foram removidos. Assim que extraídos, os reservatórios com veneno foram distribuídos e rompidos em um cadinho, para posterior leitura na célula fotoacústica. Todas as análises foram realizadas em no máximo 15 minutos após a dissecação, a fim de prevenir a degradação das toxinas. Foram realizadas em torno de 15 leituras, com cinco amostras cada, para todas as populações analisadas. Tentativas de leitura com um menor número de indivíduos para cada amostragem mostraram um sinal pequeno, dificultando as análises comparativas. Portanto, as cinco amostras foram unidas para aumentar a área de absorção do infravermelho e assim obter resultados mais precisos com a técnica. Para a utilização da técnica de FTIR-PAS não houve nenhum tipo de preparo específico para amostra.

Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier. A FTIR-PAS foi realizada usando um espectrofotômetro Thermo Nicolet Nexus 670, com detecção fotoacústica, na faixa espectral de 4000-400 cm^{-1} , área que abrange a região conhecida como impressão digital (1500 e 400 cm^{-1}). Durante o experimento, o espectrômetro foi purgado com ar comprimido seco, a fim de remover qualquer vapor de água e CO_2 . A célula fotoacústica foi purgada com gás hélio antes de cada leitura. Como referência para normalização, foi utilizado um corpo de carbono negro para coletar o espectro da fonte de infravermelho, sendo que novos espectros de referência foram realizados a cada 100 minutos. Os espectros foram obtidos com a média de 128 varreduras

das amostras, com resolução de 16 cm^{-1} . Para posterior análise comparativa, os espectros foram todos normalizados.

Análise estatística. As possíveis diferenças entre a composição de veneno das diferentes populações foram avaliadas por uma função discriminante (DFA – *Discriminant Function Analysis*), separando como variáveis as intensidades dos picos de absorção espectrais do FTIR-PAS. Este método estatístico encontra uma combinação linear das variáveis que melhor explicam as diferenças entre os grupos analisados. A distância ao quadrado de Mahalanobis foi utilizada para percepção da distância entre cada um dos grupos analisados.

RESULTADOS

Os espectros médios obtidos com as quatro populações avaliadas: área mata, urbana e intermediária na região de Dourados e da cidade de Ilhéus, por FTIR-PAS, referentes à composição química do veneno, são apresentados na Figura 1. Foram separados e identificados 15 grupos funcionais de maior relevância, relacionados aos compostos presentes no veneno, na faixa de 3625 a 500 cm^{-1} . Estes picos estão listados na Tabela 1 junto com seus números de onda e modos vibracionais correspondentes, identificados a partir de dados reportados na literatura para o veneno (Smith 1999; Lin-Vien et al. 1991). A identificação visual da distinção entre os espectros nem sempre é evidente, portanto, as intensidades de absorção foram utilizadas na construção de uma matriz para avaliar se há diferenças estatísticas significativas entre elas.

Os resultados gerados pela análise de função discriminante mostram que há uma clara distinção entre as populações (Wilk's lambda = 0.537, F= 4.63 e $p < 0.001$), conforme pode ser notado no gráfico de dispersão mostrado na Figura 2. A primeira raiz canônica explicou 50% desta separação e dos 15 picos selecionados, 8 deles contribuíram para esta distinção, como pode ser visto em destaque na Tabela 2. Entre estes, os picos 1396 e 1650, apresentam os valores mais positivos e negativos para raiz 1 e, para raiz 2, esta maior variação apareceu entre os picos 2931 e 2962. Estes quatro picos são atribuídos aos grupos funcionais, respectivamente, O-CH₂, C=N, CH₂ e CH₃, possivelmente sendo estes, os

compostos que apresentaram a maior variação na composição química do veneno entre as quatro populações avaliadas.

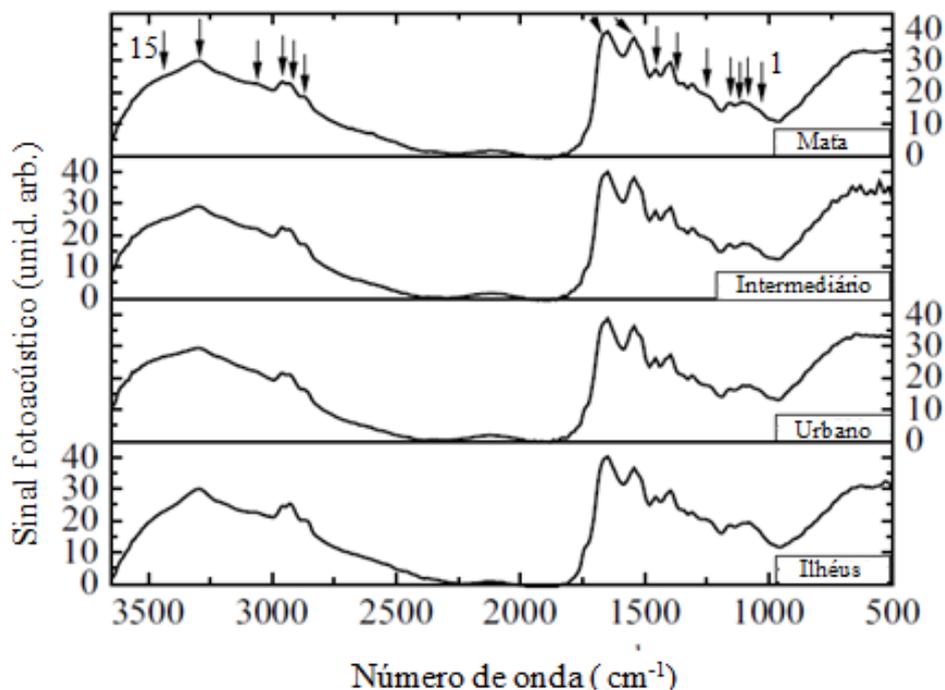


Fig. 1 Espectros de absorção do infravermelho médio do veneno das formigas de quatro populações gerados por FTIR-PAS. As setas estão indicando os 15 picos de maior relevância que foram separadas para as análises estatísticas.

A observação visual do gráfico de dispersão (Figura 2) mostra uma evidente sobreposição entre as populações de área urbana e intermediária de Dourados-MS. O valor de p e F gerado pela análise, entre esses dois ambientes, mostram que os grupos não se distinguem, o que pode ser visto na Tabela 3 e 4, assim como todas as outras comparações evidenciam que o restante das populações se agrupa conforme a área de coleta. A distância de Mahalanobis ao quadrado também mostra a maior ou menor aproximação entre os locais estudados, e mais uma vez fica evidente a proximidade entre a área urbana e a intermediária (Tabela 5). Entre as populações avaliadas, o grupo coletado em Ilhéus e o coletado em mata na região de Dourados-MS mostraram o maior distanciamento, o mesmo pode ser observado na raiz 1 do gráfico de dispersão (Figura 2), onde os pontos centrais das elipses, dos dois grupos destacados, mostram maior espaçamento entre todas as populações avaliadas.

Tabela 1. Relação dos 15 principais grupos funcionais e os respectivos modos de vibração selecionados para a análise estatística.

Pico	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Modo vibracional
1	1041	C-H	Dobramento no plano
2	1079	C-H	Dobramento no plano
3	1110	C-H	Dobramento no plano
4	1157	C-H	Dobramento no plano
5	1241	CH ₃ -CO	Estiramento simétrico
6	1396	O-CH ₂	Torção fora do plano
7	1457	O-CH ₂	Tesoura
8	1542	NH 3/ou CN (Amida II)	Torção no plano e/ou estiramento assimétrico
9	1650	C=N (Amida I)	Estiramento
10	2877	CH ₃	Estiramento simétrico
11	2931	CH ₂	Estiramento assimétrico
12	2962	CH ₃	Estiramento assimétrico
13	3093	-N-H	Dobramento harmônico
14	3293	-N-H	Estiramento
15	3425	OH	Estiramento

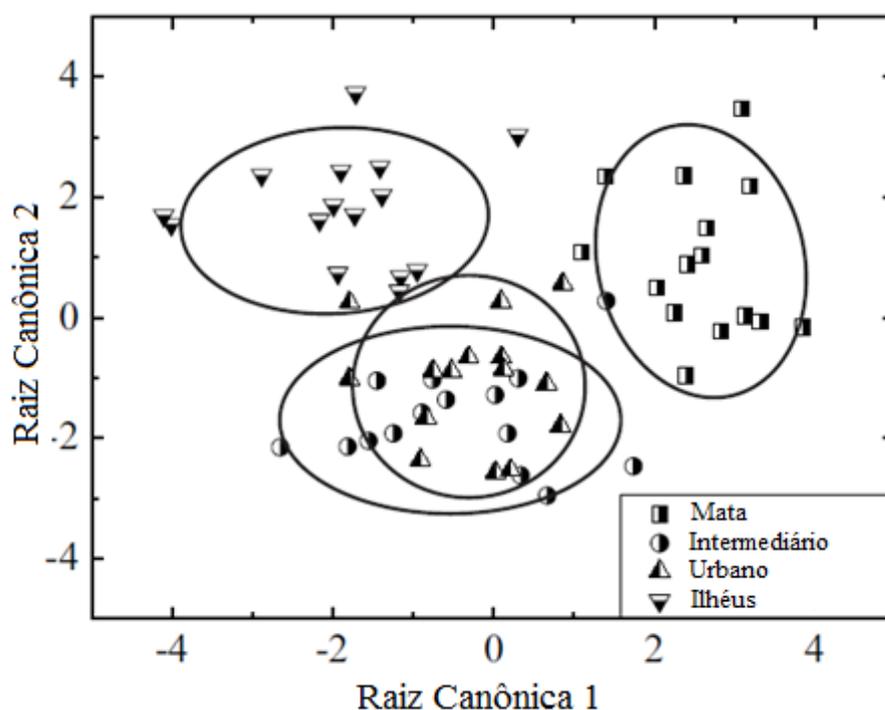


Fig. 2 Dispersão da composição química do veneno de 4 populações de áreas distintas (mata, intermediária, urbana e Ilhéus- monocultura) através da análise dos 15 picos selecionados no espectro de infravermelhos.

Tabela 2. Resultados da DFA a partir das variáveis e picos mais significativos (em destaque) do veneno obtidos por FTIR-PAS das 4 populações de formigas.

Picos	Número de onda (cm ⁻¹)	Wilks's Lambda	F	P	Raiz 1	Raiz 2
1	1041	0.07	2.94	0.004	3.21	-1.39
2	1079	0.06	1.15	0.342	-2.48	0.90
3	1110	0.06	1.47	0.235	-1.66	0.50
4	1157	0.07	3.72	0.018	1.56	-1.45
5	1241	0.06	1.20	0.319	-1.01	0.73
6	1369	0.10	11.96	<0.001	6.08	1.66
7	1457	0.06	2.35	0.086	-1.52	-1.63
8	1542	0.06	2.85	0.048	2.58	0.38
9	1650	0.10	12.04	<0.001	-6.21	-0.83
10	2877	0.06	0.98	0.408	-0.74	1.70
11	2931	0.08	6.31	0.001	2.55	4.66
12	2962	0.07	4.18	0.011	-2.48	-5.77
13	3093	0.06	1.88	0.147	-1.03	0.55
14	3293	0.07	3.50	0.023	2.62	0.03
15	3425	0.06	0.90	0.446	0.43	0.18

Tabela 3. Valor de p entre as quatro populações *Ectatomma brunneum*.

População	Mata	Intermediário	Urbano	Ilhéus
Mata		<0.001	<0.001	<0.001
Intermediário	<0.001		0.122	<0.001
Urbano	<0.001	0.122		<0.001
Ilhéus	<0.001	<0.001	<0.001	

Tabela 4. Valor de F entre as quatro populações *Ectatomma brunneum*.

População	Mata	Intermediário	Urbano	Ilhéus
Mata		6.14	5.05	7.71
Intermediário	6.14		1.58	5.59
Urbano	5.05	1.58		4.60
Ilhéus	7.71	5.59	4.60	

Tabela 5. Distância de Mahalanobis ao quadrado entre as quatro populações *Ectatomma brunneum*.

População	Mata	Intermediário	Urbano	Ilhéus
Mata	0.00	16.39	13.48	20.57
Intermediário	16.39	0.00	4.20	14.91
Urbano	13.48	4.20	0.00	12.28
Ilhéus	20.57	14.91	12.28	0.00

DISCUSSÃO

As análises mostraram que a composição química do veneno dos diferentes locais de coleta de *E. brunneum*, exceto da área intermediária e urbana, são estatisticamente diferentes. Mesmo entre as espécies coletadas no mesmo município, em Dourados – MS, que contavam com uma maior proximidade geográfica e conseqüentemente a mesma faixa climática e até uma maior chance de parentesco, foi possível encontrar diferenças significativas. Por outro lado, a sobreposição entre os indivíduos coletados na área intermediária e urbana, provavelmente ocorreu devido às duas áreas apresentarem condições ambientais similares, uma vez que ambas sofrem interferência de ações antrópicas, presença de edificações, com vegetações arbustivas e gramíneas.

Portanto, os resultados demonstram que, ao menos em parte, a composição química do veneno esta atrelada a fatores exógenos do local em que as colônias estão nidificadas. De fato, as interferências das variações geográficas sobre os aspectos químicos, e até

comportamentais dos animais, existem em todas as espécies e tendem a ser ocasionadas pelas adaptações ao ambiente (Ridley 2006), sendo relevantes as diferenças populacionais.

A resposta do veneno a fatores exógenos também ocorreu em experimento realizado por Cologna et al. (2013). Estes autores mostraram que a composição do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps*, também varia de acordo com o local de coleta. De uma média de 335 compostos encontrados em cada população, apenas 48 eram compartilhados entre as diferentes populações, sendo esses, provavelmente, os responsáveis pelo perfil químico do veneno desta espécie. Fox et al. (2012) também encontraram diferenças entre a composição do veneno entre populações de *Solenopsis saevissima*. Contudo, os autores atribuíram essas diferenças a análise de possíveis espécies crípticas, ao invés de populações de uma mesma espécie.

A variação da composição do veneno de diferentes locais geográficos, também já foi relatada em outras espécies de animais, sobretudo em cobras e escorpiões. A variabilidade na composição e nas atividades biológicas do veneno de serpentes vem sendo documentadas por inúmeros autores e pode ser observada em diversos níveis, tais como, variações ontogenéticas, geográficas, sazonais e sexuais (Chippaux et al. 1991; Mendonza et al. 1992, Sanchez et al. 1992; Tan e Ponnururai 1992). Tsai et al. em 2004, por exemplo, mostraram que há diferença entre a fosfolípide A2, presente no veneno da víbora *Trimeresurus stejnegeri*, entre diferentes populações. Segundo estes autores os resultados encontrados ocorreram devido ao isolamento geográfico e o tipo de presas disponíveis em cada população. Santoro et al. (1999), por outro lado, encontraram poucas diferenças entre três subespécies de *Crotalus durissus*, sendo que as maiores diferenças estão associadas as distâncias geográficas entre as populações.

Badhe e colaboradores (2006) mostraram que há diferenças no padrão de proteínas do veneno do escorpião vermelho, *Mesobuthis tamulus*, do oeste e sul da Índia, sendo estas diferenças atribuídas a fatores ambientais, como a dieta. Abdel-Rahman et al. (2009), também encontraram variações entre populações de escorpiões de quatro localidades do Egito. Outras espécies peçonhentas de invertebrados também apresentam este tipo de variação da composição de veneno, como em anêmonas do mar (Ortiz et al. 2013), caracóis (Romeu et al. 2008) e aranhas (Palagi et al. 2013).

Em himenópteros sociais, Ferreira Jr. et al. (2010) investigaram a diversidade intra-específica de melitina e fosfolipase A2 no veneno de *Apis mellifera* e associaram esta

variação com fatores como: idade, variações sazonais e alimentação. As diferenças climáticas, por exemplo, podem resultar em uma distribuição distinta das espécies de presas e condicionalmente, influenciar na alimentação dos organismos (Abdel-Rahaman, 2009). A variação do tipo de solo entre os ambientes, conseqüentemente, também tem potencial nestas distinções, já que influenciará na variação de vegetação, modificando, por conseguinte, espécies de presas de formiga que são consumidoras de plantas específicas.

Cabe aqui, portanto, salientar que as amostragens de *E. brunneum* foram coletadas em uma mesma estação; todos os espécimes pertenciam a mesma casta e estavam em atividade de forrageamento; a quantidade amostrada foi alta, possivelmente minimizando interferências como, as condições de cada indivíduo e também a idade; e pelo menos quanto as populações de Dourados, todas estavam em uma mesma faixa climática

Os resultados indicam que as diferenças locais, como microclima, disponibilidade de presas, entre outros fatores exógenos, foram determinantes para as variações encontradas. Dentre estes fatores, o tipo de presa pode ser vista com destaque, uma vez que uma das principais funções deste composto é a captura e morte das presas (Aird and Silva 1991; Cogo et al. 1993; Daltry et al. 1996).

Alguns trabalhos mostram a adaptação do veneno a suas principais fontes de alimento. Experimentos realizados com cobras mostram que a variação geográfica e a composição da peçonha refletem a genética e necessidade relacionada à captura da dieta local, produzindo diferentes populações com diferentes relações veneno/presa (Creer et al. 2003; Casewell et al. 2013). Outro exemplo é o do trabalho de Orivel (2001) com 12 diferentes espécies do gênero *Pachycondyla*, ambas predadoras generalistas. Nele encontraram diferenças na potencialidade dos venenos entre as espécies com nidificação em árvores e no solo, sendo que espécies arbóreas, que apresentam maior dificuldade para capturar presa, exibem maior toxicidade em comparação às outras, mostrando assim, que o ambiente está diretamente associado à composição do veneno.

Por outro lado, um trabalho realizado com vespa mantida em cativeiro, foi relatado que a composição da peçonha de *Pimpla turionellae*, uma espécie solitária, não se alterou sob oferta de dieta controlada, apenas mostrando uma interferência de um dos compostos presentes no alimento (Uçkan et al. 2006). Em um trabalho realizado por Daltry et al. (1996), os autores mostraram que o veneno da serpente *C. rhodostoma*, nascidas em cativeiros, apresentaram padrões de composição idênticos aos espécimes selvagens da

mesma localidade da origem das suas gerações anteriores. Deduzindo que fatores genéticos também são determinantes na composição do veneno.

No entanto, embora a maior parte dos animais biossintetizem sua defesa química, em alguns casos, os compostos são adquiridos de fontes externas, que podem incluir relações simbióticas com outros organismos ou sequestro de fontes de dieta (Ruxton et al. 2004). A especialização da dieta é comum entre os organismo que compõem seus aparatos químicos a partir da alimentação (Nishida 2002) Alguns trabalhos têm mostrado que espécies de rãs se alimentam de presas específicas, a fim de compor e, ou, potencializar seu veneno. Um trabalho realizado por Saporito (2007) com a espécie *Oophaga pumilio* mostra que a principal fonte de alcaloides desta espécie é derivada de ácaros Oribatides. Outro trabalho mostra, ainda, que esta espécie de rã apresenta variação dos seus alcaloides “sequestrados” conforme sua região de origem (Saporito 2006). Outros exemplos de sequestro de substâncias do ambiente como forma de compor o veneno são encontrados em insetos fitófagos (Opitz e Muller 2009), grupos de invertebrados marinhos, como moluscos (McPhail et al. 2001), cobras natricines (Hutchinson et al. 2007) e pássaros insetívoros, do gênero *Pitohui* e *Ifrita* (Dumbacher et al. 1992; Dumbacher et al. 2000).

Portanto, no caso de *E. brunneum*, os fatores exógenos são determinantes para compor seu veneno, assim como observado em outros inúmeros animais peçonhentos invertebrados ou vertebrados. Destes, de acordo com a literatura, a dieta deve ser preponderante, uma vez que, animais podem sequestrar substâncias do meio para compor a química do veneno.

CONCLUSÃO

Os resultados corroboram com as evidências descritas por outros trabalhos, de que a composição do veneno é determinada não só geneticamente, mas também por compostos obtidos no meio ambiente, principalmente de sua dieta. Estas variações exibidas, no entanto, também são uma resposta às pressões do ambiente, adequando a composição de veneno ao tipo de presas disponíveis. Além disso, a FTIR-PAS se mostrou uma ferramenta bastante útil, principalmente para se somar a técnicas que possam auxiliar nas pesquisas com veneno.

REFERÊNCIAS

Abdel-Rahman MA, Omran MAA, Abdel-Nabi IM, Ueda H, Mcvean (2009) A. Intraspecific variation in the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* venom collected from different biopes. *Toxicon* 53:349-359.

Aird, SD, Silva JN (1991) Comparative studies enzymatic of brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp Biochem Physiol B* 99:287-294.

Almeida FS, Lima SM, Andrade LHC, Suárez YR (2012) Differentiation of Neotropical fish species with statistical analysis of Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy data. *Appl Spectrosc* 66:782-785.

Antonialli- Junior WF, Lima SM, Andrade LHC, Suárez YR (2007) Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genetics Mol Res* 6:492-499

Antonialli- Junior WF, Suarez YR, Izida T, Andrade LHC, Lima SM (2008) Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (2008) *Genetics Mol Res* 7:559–566

Badhe RV, Thomas AB, Harer SL, Deshpande AD, Salvi N, Waghmare A. (2006) Intraspecific variation in protein pattern of red scorpion (*Mesobuthus Tamulus*, *Coconsis*, *Pocock*) venoms from western and southern India. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 12:612-619.

Billen J. Morphology of exocrine glands in social insects with special emphasis on the contributions by Italian researchers (2004). *Insect Soc Life* 5:69-75

Blaylock RSM (2000) Antibacterial properties of KwaZulu Natal snake venoms. *Toxicon* 38:1529–1534.

Brown Junior WR (1958) Contributions toward a reclassification of the Formicidae. II Tribe Ectatomminae (Hymenoptera). Bull Mus Comp Zool Harvard 118:175-362.

Casewell NR, Wüster W, Vonk FJ, Harrison RA, Fry BG (2013) Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. Cell Press 28:219–29.

Chippaux JP, Williams V, White J (1991) Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon 29: 1279-1303.

Cogo JC, Prado-Francischetti J, Cruz-Hofling MA, Corrado AP, Rodrigo-Simioni L (1993) Effects of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. Toxicon 31:1237-1247.

Cologna CT, Cardoso JS, Jourdan E, Degueldre M, Upert NG, Uetanabaro APT, Costa Neto EM, Thonart P, Pauw E, Quinton L (2013) Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four different areas of Brazil. J Proteomics 94:413-422.

Creer S, Malhotra A, Thorpe RS, Stocklin R, Favreau P, Chou WH (2003) Genetic and ecological correlates of intraspecific variation in pit viper venom composition detected using matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and isoelectric focusing. J Mol Evol 56:317–329.

Daltry JC, Wuster W, Thorpe RS (1996). Diet and venom evolution. Nature 379:537-540.

Dumbacher JP, Beehler BM, Spande TF, Garraffo HM, Daly JW (1992) Homobatrachotoxin in the genus Pitohui: Chemical defense in birds? Science 258:799-801.

Dumbacher JP, Spande TF, Daly JW (2000) Batrachotoxin alkaloids from passerine birds: a second toxic bird genus (*Ifrica kowaldi*). Proc Natl Acad Sci USA 97:12970-12975.

Edstrom, A (1992) *Venomous and Poisonous Animals*. Krieger Publishing Company, Malabar.

Evans JD, Pierce NE (1995) Effects of diet quality and queen number on growth in Leptothoracine ant colonies (Hymenoptera: Formicidae). *J New York Entomol Soc* 103:91-99

Favreau P, Menin L, Michalet S, Perret F, Cheneval O, Stocklin M, Bulet P, Stocklin R (2006) Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case application with single arthropod specimen. *Toxicon* 47:676-687.

Ferreira Junior RS, Sciani JM, Marques-Porto R, Lourenço Jr A, Orsi RO, Barravieira B, Pimenta DC (2010) Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. *Toxicon* 56:355–362.

Fox EGP, Pianaro A, Solis DR, Delabie JHC, Vairo BC, Machado EA, Bueno OC (2012) Intraspecific and Intracolony Variation in the Profile of Venom Alkaloids and Cuticular Hydrocarbons of the Fire Ant *Solenopsis saevissima* Smith (Hymenoptera: Formicidae). *Psyche* 1-10.

Giannotti E, Machado VLL (1992) Notes on the foraging of two species of Ponerinae ants: Food and resources and daily hunting activities (Hymenoptera: Formicidae). *Bioikos*, 6:7-17.

Greene RV, Gordon SH, Jackson MA, Bennett GA (1992) Detection of fungal contamination in corn: potential of PAS-FTIR and DRS. *J Agric Food Chem* 40:1144-1149.

Harrison RA, Cook DA, Renjifo C, Caseweel NR, Currier RB, Wagstaff SC (2011) Research strategies to improve snakebite treatment: challenges and progress. *J Proteomics* 74:1768–80.

Hutchinson DA, Mori A, Savitzky AH, Burghardt GM, Wu X, Meinwald J, Shroeder FC (2007) Dietary sequestration of defensive steroids in nuchal glands of the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. Proc Natl Acad Sci USA 104: 2265-2270.

Kempf WW (1972) Catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). Stud Entomol 15:1-344.

Koh DC, Armugam A, Jeyaseelan K (2006) Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell Mol Life Sci 63:3030-3041.

Lima PRM, Brochetto-Braga MR (2003) Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 9:149-162.

Lin-Vien D, Colthup NB, Fateley WG, Grasselli JG (1991) Infrared And Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. Academic Press, San Diego New York Boston London Sydney Tokyo Toronto.

Maclintal EA, Starr CK (1996) Comparative morphology of the stinger in the social wasp genus *Ropalidia* (Hymenoptera: Vespidae). Memoirs of the Entomological Society of Washington 17:108-115.

Marques OM, Viana CHP, Kamoshida M, Carvalho CAL, Santos GMM (1995) Hábitos de nidificação e alimentares de *Ectatomma quadridens* (Fabricius, 1793) (Hymenoptera, Formicidae) em Cruz das Almas – Bahia. Insecta 4:1-9.

Martin S, Drijfhout F (2009) A Review of Ant Cuticular Hydrocarbons. J Chem Ecol 35:1151-1161.

McPhail KL, Davies-Coleman MT, Starmer JA (2001) Sequestered chemistry of the arminacean nudibranch *Leminda millecra* in Algoa Bay, South Africa. J Nat Prod 64: 1183-1190.

Mendoza CEC, Bhatti AR (1992) Eletrophoretic analysis of snake venoms. *J Chromatogr* 580:355-363.

Neves EF, Andrade LHC, Suarez YR, Lima SM, Antonialli-Junior WF (2012) Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genetics Mol Res* 11:1891-1898.

Neves EF, Montagna TS, Andrade LHC, Suárez YR, Lima SM, Antonialli-Junior WF (2013) Social parasitism and dynamics of cuticular hydrocarbons in paper wasp of the *Mischocyttarus*. *J Kansas Entomol Soc* 86:69-77.

Nishida R. Sequestration of Defensive Substances from Plants by Lepidoptera (2002) *Annu Rev Entomol* 47:57-92.

Opitz SEW, Müller C (2009) Plant chemistry and insect sequestration. *Chemoecology* 19:117–154.

Oren Z, Shai Y (1997) Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure-function study. *Biochemistry* 36:1826–1835.

Orts DJB, Peigneur S, Madio B, Cassoli JS, Montandon GG, Pimenta AMC, Bicudo JEPW, Freitas JC, Zaharenko AJ, Tytgat J (2013) Biochemical and electrophysiological characterization of two sea anemone type 1 potassium toxins from a geographically distant population of *Bunodosoma caissarum*. *Marine Drugs* 11:655–79.

Overall WL (1986) Recrutamento e divisão de trabalho em colônias naturais da formiga *Ectatomma quadridens* (Fabr.) (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi (Zoologia)* 2:113-135.

Orivel J, Dejean A (2001) Comparative effect of the venoms of ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera Ponerinae). *Toxicon* 39:195–201.

Orivel J, Redeker V, Le Caer JP, Krier F, Revol-Junelles AM, Longeon A, Chaffotte A, Dejean A, Rossier J (2001) Ponericins New Antibacterial and Insecticidal Peptides from the Venom of the Ant *Pachycondyla goeldii*. *J Biol Chem* 276:17823–17829.

Palagi A, Koh JMS, Leblanc M, Wilson D, Dutertre S, King GK, Graham M, Nicholson (2013) Unravelling the complex venom landscapes of lethal Australian funnel-web spiders (Hexathelidae: Atracinae) using LC-MALDITOF mass spectrometry. *J Proteomics* 80:292–310.

Palma MS (2006) Insect Venom Peptides. In: Kastin AJ (ed) *The Handbook of Biologically Active Peptides*. Oxford: Academic Press, pp 409-416.

Porter SD (1989) Effects of diet on the growth of laboratory fire ant colonies (Hymenoptera: Formicidae). *J Kansas Entomol Soc* 62:288-291.

Ridley M (2006) *Evolução*. Porto Alegre: Artmed.

Romeo C, Di FL, Oliverio M, Palazzo P, Massilia GR, Ascenzi P, Polticelli F, Schininà ME (2008) Conusventricosus venom peptides profiling by HPLC-MS: a new insight in the intraspecific variation. *J Sep Sci* 31:488–98.

Ruxton GD, Sherratt TN, Speed, MP (2004) *Avoiding attack: the evolutionary ecology of crypsis, warning signals, and mimicry*. Oxford: Oxford University Press.

Sanchez EF, Freitas TV, Ferreira-Alves DL, Velarde DT, Diniz MR, Cordeiro MN, Agostini-Costa G, Diniz CR (1992) Biological activities of venoms from south american snakes. *Toxicon* 30:95-103.

Santoro ML, Sousa-e-Silva MCC, Gonçalves LRC, Santos SMA, Ferreira ILL, Saiki M, Peres CA, Sano-Martins IS (1999) Comparison of the biological activities of three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus*). *Comp Biochem Physiol* 112:61–73.

Saporito RA, Donnelly MA, Norton RA, Garraffo HM, Spande TF, Daly JW (2007) Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:8885-8890.

Schmidt JO (1986) Chemistry, pharmacology and chemical ecology of ant venoms. In: Piek T (ed) *Venoms of the Hymenoptera, Biochemical, Pharmacological and Behavioral Aspects*. London: Academic Press, pp 425-508.

Smith BC (1999) *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong HT (2007) Therapeutic application of anti-arthritis, pain releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol Ther* 115:246-270.

Tan NH, Ponnudurai GA (1992) Comparative study on the eletrophoretic patterns of snake venoms. *Comp Biochem Physiol* 102:103-109.

Tsai IH, Wang YM, Chen Y, Tsai TS, Tu MC (2004) Venom phospholipases A2 of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization , geographic variations and evidence of multiple ancestries. *Biochemical Society* 223:215-223.

Veloso HP, Rangel Filho ALR, Lima JCA (1991) *Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal*. Rio de Janeiro: IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais.

Whitman DW, Blum MB, Alsop DW (1990) Allomones: Chemicals for Defense. In: Evans DL, Smith J (ed) *Insect Defenses*. Albany, USA: State University of New York Press, pp 289–351.

Uçkan F, Ergin E, Rivers DB, Gençer N (2006) Age and diet influence the composition of venom from the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 63:177–87.

Zelezetskya I, Pagb U, Antchevaa N, Sahlb HG, Tossia A (2005) Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. Arch Biochem Biophys 434:358–364.

Yan L, Adams ME (1998) Lycotoxins, Antimicrobial Peptides from Venom of the Wolf Spider *Lycosa carolinensis*. J Biol Chem 273:2059–2066, 1998.

CAPÍTULO 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que, de fato, os fatores exógenos são determinantes tanto na composição de veneno, quanto na composição química cuticular de *Ectatomma brunneum*. Destes fatores a dieta se destaca na variação química entre as populações, provavelmente devido a uma resposta da espécie para se adequar as condições locais, sobretudo, ao tipo de presas disponíveis, no caso dos venenos, mas também quanto a compostos cuticulares.

A eficiência da técnica de FTIR-PAS pode mais uma vez ser observada, assim como em outros exemplos encontrados na literatura, mostrando que a técnica pode até mesmo substituir outros métodos ou ser usada como uma forma de somar dados às técnicas mais usuais. Ademais, a técnica é muito favorável para estudo com sistemas biológicos principalmente pela sua reprodutibilidade.

Os resultados puderam proporcionar, além do maior esclarecimento sobre os temas específicos, a descrição do método de análise (se tratando especificamente do veneno), podendo assim, colaborar com o desenvolvimento de trabalhos futuros.

O esclarecimento de que a dieta é determinante para composição destes compostos químicos pode abrir um leque de investigações acerca do uso do veneno de Himenópteros para produção de fármacos, já que esta variação poderia interferir no desenvolvimento destes trabalhos, assim como, na produção de soros anti-venenos.

Cabe ressaltar que a produção de conhecimento sobre o tema ainda deve ser explorada, principalmente quanto ao veneno, em que a resposta ao ambiente deixa margens a perguntas, principalmente de como a dieta interfere nestas alterações.