

CARLOS LUIS NEVES JUNIOR

**SERIAM OS METIL ALCANOS DESENCADEADORES DE COMPORTAMENTO
AGRESSIVO DE *Azteca muelleri* EMERY, 1893 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)?**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

N518c
2021
Neves Junior, Carlos Luis, 1996-
Seriam os metil alcanos desencadeadores de
comportamento agressivo de *Azteca muelleri* Emery, 1893
(Hymenoptera: Formicidae)? / Carlos Luis Neves Junior. –
Viçosa, MG, 2021.
29 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 26-29.

1. Formigas - Comportamento. 2. Hidrocarbonetos.
3. Cutícula animal. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Entomologia. Programa de Pós-Graduação em
Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 595.796

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fatima Alves CRB6/2578

CARLOS LUIS NEVES JUNIOR

SERIAM OS METIL ALCANOS DESENCADEADORES DE
COMPORTAMENTO AGRESSIVO DE *Azteca muelleri* EMERY,
1893 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)?

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em
Entomologia, para obtenção do título *Magister
Scientiae*

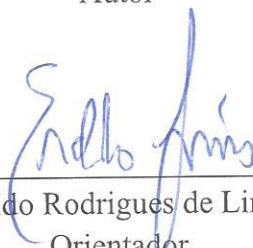
APROVADA: 15 de junho de 2021.

Assentimento:



Carlos Luis Neves Junior

Autor



Eraldo Rodrigues de Lima

Orientador

*Dedico à minha mãe, Orineide, e às minhas avós,
Elizabeth e Lucimar, pelo incondicional amor.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pela formação exímia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa e financiamento da pesquisa.

Ao professor Eraldo, pela orientação, ensinamentos e amizade.

Ao professor Ricardo, pelos ensinamentos e oportunidade de trabalhar com esses insetos incríveis.

Ao Laboratório de Semioquímicos da Universidade Federal do Paraná, em especial, ao Douglas, pelo esforço e prontidão.

À Gabriela, pela paciência e disponibilidade em ajudar e contribuir para este trabalho.

À minha mãe e avós, pelo apoio, torcida e amor incondicional.

Aos companheiros do Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos: Giovana, Kárenn, Laura, Luis, Manuel, Marcondes, Natália, Pedro, Sofia, Suellen e Wellington, pela amizade, aprendizado, acolhimento, companhia e muitos cafés da tarde.

Aos amigos da minha turma de mestrado: Carolina, Daiane, Daniel, Jéssica, Jose, Júlia, Otávio e Thayna, pelos muitos ensinamentos, companheirismo e amizade.

A todos os profissionais do Departamento de Entomologia, pelo ensino e pesquisa de qualidade, pela prontidão e disponibilidade.

Ao Grupo de Estudos em Entomologia - Insectum, pela formação multidisciplinar, experiências, troca de vivências e momentos de descontração.

À Alexandra Elbakyan, criadora do site Sci Hub, por quebrar as barreiras do conhecimento e democratizar a informação.

A todos os amigos, amigas e familiares que, direta ou indiretamente, me deram forças para manter a cabeça erguida durante toda essa caminhada.

Muito obrigado!

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo”.

(Nelson Mandela)

RESUMO

NEVES JUNIOR, Carlos Luis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2021. **Seriam os metil alcanos desencadeadores de comportamento agressivo de *Azteca muelleri* Emery, 1983 (Hymenoptera: Formicidae)?** Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima.

Em insetos eussociais, o processo reconhecimento de companheiros de ninho é tarefa imprescindível para a manutenção do equilíbrio e integridade da colônia. Tal processo baseia-se na presença de hidrocarbonetos cuticulares, os quais estão inclusos os metil alcanos, compostos de cadeia longa abundante em formigas. Dentre os diversos sinais de comunicação química desencadeados pelos metil alcanos, esses compostos também podem estar envolvidos em comportamentos agressivos voltados para a defesa da colônia. Porém, em relações mutualísticas formiga-planta, o alvo de proteção, além da colônia, é a planta hospedeira. O objetivo geral desse trabalho é determinar experimentalmente a importância de compostos da família dos metil alcanos na determinação do comportamento de agressividade de *Azteca muelleri*, espécie que habita *Cecropia glaziovii*, planta pioneira e de caule oco. As avaliações foram realizadas em arena com pares de formigas da mesma colônia e as respostas comportamentais das formigas com relação à agressividade foram analisadas. Testamos (i) qual metil alcano apresenta maior agressividade, (ii) qual concentração do metil alcano de maior agressividade é ideal para os testes e (iii) comparamos os comportamentos de agressividade intracolônia em diferentes colônias. Nossos resultados mostraram que o composto 13-metilhentriacontano desencadeia um estranhamento entre formigas da mesma colônia, principalmente em concentração de 0,3 ng/mL, apresentando resultado também significativo quando testado em diferentes colônias. As observações com 11-metilnonacosano também apresentaram estranhamento, mas sugerimos que novos estudos acerca dos efeitos desse composto no comportamento dessa espécie sejam realizados, focando nos demais compostos. Os dados apresentados neste trabalho colaboram para o entendimento de ações de extrema importância para a sobrevivência da colônia: o reconhecimento de companheiros e a agressividade. Enquanto parte de um sistema mutualístico, estudos sobre o comportamento das formigas *A. muelleri* nos ajudam a compreender não apenas seus meios de comunicação, como também as configurações de sua relação sua planta hospedeira, *C. glaziovii*.

Palavras-chave: Formigas. Agressividade. Hidrocarbonetos cuticulares.

ABSTRACT

NEVES JUNIOR, Carlos Luis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2021. **Could methyl alkanes trigger aggressive behavior in *Azteca muelleri* Emery, 1893 (Hymenoptera: Formicidae)?** Adviser: Eraldo Rodrigues de Lima.

In eusocial insects, the nestmate recognition process is an essential task to maintain the balance and integrity of the colony. This process is based on the presence of cuticular hydrocarbons, which include methyl alkanes, long-chain compounds abundant in ants. Among the various chemical communication signals triggered by methyl alkanes, these compounds may also be involved in aggressive behavior aimed at colony defense. However, in mutualistic ant-plant relationships, the target of protection, in addition to the colony, is the host plant. The general objective of this work is to experimentally determine the importance of compounds from the methyl alkanes family in determining the aggressive behavior of *Azteca muelleri*, a species that inhabits *Cecropia glaziovii*, a pioneer plant with a hollow stem. The evaluations were carried out in an arena with pairs of ants from the same colony and the behavioral responses of the ants regarding aggressiveness were analyzed. We tested (i) which methyl alkane is more aggressive, (ii) which concentration of the most aggressive methyl alkane is ideal for testing, and (iii) we compare intracolony aggressive behaviors in different colonies. Our results showed that the compound 13-methylhentriacontane triggers an estrangement between ants of the same colony, mainly at a concentration of 0.3 ng/mL, showing a significant result when tested in different colonies. The observations with 11-methylnonacosane were also of estrangement, but we suggest that further studies on the effects of this compound on the behavior of this species be carried out, focusing on the other compounds. The data presented in this work contribute to the understanding of extremely important actions for the colony's survival: the recognition of nestmates and aggressiveness. As part of a mutualistic system, studies on the behavior of *A. muelleri* ants help us to understand not only their means of communication, but also the configurations of their relationship with their host plant, *Cecropia glaziovii*.

Keywords: Ants. Aggressiveness. Cuticular hydrocarbons.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Localização da área de coleta das colônias. Autor: Neves Jr, C. L. (2021). 12
- Figura 2 – Esquema da arena utilizada no teste de comportamento. As formigas, para fins ilustrativos, não correspondem à espécie *Azteca muelleri*. Autor: Neves Jr, C. L. (2021). 14
- Figura 3 – Esquema dos experimentos executados neste trabalho. 16
- Figura 4 – Porcentagem dos níveis de interação (0 a 5) das formigas *Azteca muelleri* observados nas arenas, para os compostos: 13-Me-C25, 11-Me-C27, 11-Me-C29 e 13-Me-C31..... 18
- Figura 5 – Índice de agressividade das formigas *A. muelleri* para os diferentes compostos: 13-Me-C25, 11-Me-C27, 11-Me-C29 e 13-Me-C31 (A) e concentrações 0,25 ng/mL, 0,3 ng/mL, 0,35 ng/mL e 0,4 ng/mL (B). As barras representam a média (\pm S.E.) e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Os valores de P são dados para tratamentos [modelo linear generalizado (família, Gaussiana)] seguido por comparações de pares de médias de mínimos quadrados (LSMeans). 19
- Figura 6 – Porcentagem dos níveis de interação (0 a 5) das formigas *Azteca muelleri* observados nas arenas, para o composto 13-Me-C31. 20
- Figura 7 – Índices de agressividade das formigas *Azteca muelleri* observados em cada um dos tratamentos (0 ng/mL, 0,3 ng/mL, 3 ng/mL e 30 ng/mL) realizados com 13-Me-C31. As barras representam a média (\pm S.E.) e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Os valores de P são dados para tratamentos [modelo linear generalizado (família, Gaussiana)] seguido por comparações de pares de médias de mínimos quadrados (LSMeans). 21
- Figura 8 – Porcentagem dos níveis de interação (0 a 5) das formigas *Azteca muelleri* observados nas arenas com plantas diferentes, para o composto 13-Me-C31..... 22
- Figura 9 – Índices de agressividade das formigas *Azteca muelleri* observados no controle (0 ng/mL) e no tratamento com 0,3 ng/mL de 13-Me-C31. As barras representam a média (\pm S.E.) e o asterisco indica a diferença entre os tratamentos ($P < 0,001$). Os valores de P são dados para tratamentos [modelo linear generalizado (família, Gaussiana)]. 22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1. Área de coleta da colônias	12
2.2. Aplicação do composto	13
2.3. Teste de comportamento	13
2.4. Índice de agressividade	14
2.5. Experimento I: Testando os metil-alcanos	15
2.6. Experimento II: Encontrando a melhor concentração de 13-metilhentriacontano (13-Me-C31)	15
2.7. Experimento III: 13-metilhentriacontano (13-Me-C31) como estimulador da agressividade	15
2.8. Análise estatística	16
3. RESULTADOS	18
3.1. Experimento I: Testando os metil-alcanos	18
3.2. Experimento II: Encontrando a melhor concentração de 13-metilhentriacontano (13-Me-C31)	19
3.3. Experimento III: 13-metilhentriacontano (13-Me-C31) como estimulador da agressividade	21
4. DISCUSSÃO	23
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

A troca de informações entre seres vivos se dá de diversas maneiras e, nos insetos, a comunicação química é a primordial (MARTIN; DRIJFHOUT, 2009). Em insetos eussociais, o reconhecimento de companheiros de ninho é tarefa imprescindível para a manutenção do equilíbrio e integridade da colônia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Tal processo permite que eles se comportem de maneira altruísta com seus companheiros, mas rejeitem automaticamente outros da mesma espécie e de colônia diferente (LENOIR et al., 2009). Assim, o reconhecimento do companheiro de ninho representa a primeira linha de defesa de uma colônia (VANDER MEER et al., 2019), consistindo na expressão, detecção e percepção de pistas de reconhecimento e a ação correspondente com base nas diferentes informações emitida pelo outro indivíduo (STURGIS; GORDON, 2012; FERGUSON et al., 2020).

O processo de reconhecimento intracolônia baseia-se na presença de hidrocarbonetos cuticulares (CHC), substâncias que, a priori, servem para evitar a dessecação e proteger os insetos contra o estresse biótico e abiótico (HOWARD; BLOMQUIST, 2005; VANDER MEER et al., 2019). Os CHCs são herdados pela prole ou passados via trofalaxia e, sendo ferramentas de reconhecimento da colônia (CROZIER; DIZ, 1979), também são base para a agressividade intraespecífica.

A identidade da colônia, ou *template*, é formada por uma mistura de substâncias (*blend*) a qual determina a identificação intra e interespecífica. Dessa forma, para reconhecer seus companheiros, cada indivíduo usa sua própria identidade em comparação com a dos demais integrantes (VANDER MEER et al., 2019), a qual pode sofrer alterações ao longo da vida devido a fatores como casta, sexo, estágio de desenvolvimento e divisão de tarefas (GREENE; GORDON, 2003). Ou seja, no processo de reconhecimento, um indivíduo é considerado reconhecido quando aquele que está analisando reconhece que o *template* do analisado é suficientemente semelhante ao seu próprio (NUNES et al., 2008).

Dentre os principais organismos que realizam este tipo de comunicação, as formigas representam o principal modelo para estudos de reconhecimento químico entre insetos sociais (MARTIN; DRIJFHOUT, 2009), mas ainda há muito o que se descobrir sobre a função individual dos CHCs que compõem o *template*, ou até mesmo cada grupo de CHC, nas atividades da colônia. Dos CHCs que constituem o *template* em formigas, os metil alcanos são os mais abundantes, após os n-alcanos. Mesmo apresentando tamanha presença nesses insetos, metil alcanos podem ser usados como sinais de comunicação química (MARTIN; DRIJFHOUT, 2009), e ainda como promotor de comportamentos agressivos (BOULAY et al., 2004; SANO; BANNON; GREENE, 2018; ZORZAL et al., 2021).

A manifestação de agressividade em formigas é voltada para a defesa da colônia (BOS; D'ETTORRE, 2012). Porém, em relações mutualísticas formiga-planta, o alvo de proteção, além da colônia, é a planta hospedeira (HEIL; MCKEY, 2003). Nessas relações, a agressividade é fator inerente à relação entre os organismos mutualísticos. Essa característica favorece a colônia em diversos aspectos, desde a manutenção e sobrevivência da mesma até a preservação da planta hospedeira, que oferece, além de abrigo, alimento à colônia (RICKSON, 1976; HEIL; MCKEY, 2003).

Tendo em vista o comportamento e comunicação de formigas, os fatores que envolvem a agressividade dessas e a contribuição para informações sobre perfil químico e agressividade de formigas mutualísticas com plantas, investigamos o possível (ou possíveis) compostos envolvidos no comportamento de agressividade de *Azteca muelleri*, espécie que habita *Cecropia glaziovii*, planta pioneira e de caule oco. Existem evidências de que os metil alcanos estão relacionados com a agressividade nessa espécie (ZORZAL et al., 2021) e que, assim como outras do mesmo gênero, possui forte agressividade contra herbívoros e outros organismos que venham a ameaçar a integridade da planta hospedeira (OLIVEIRA et al., 2015; CARNEIRO et al., 2018).

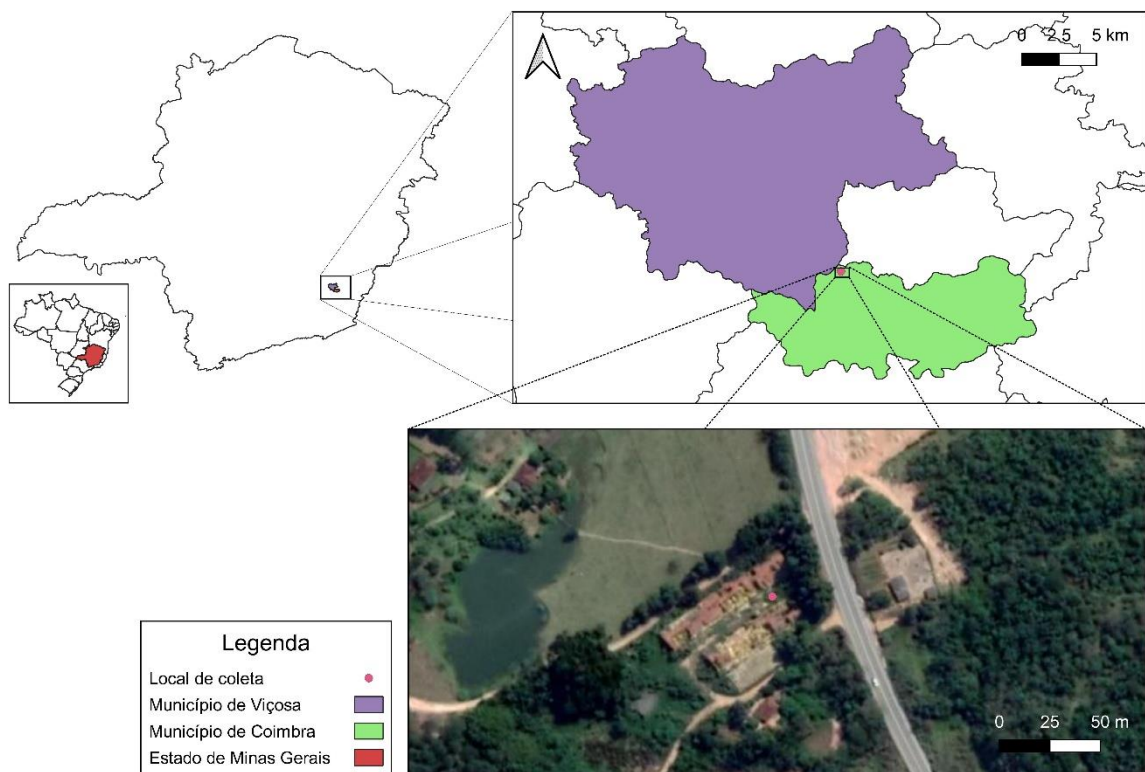
A partir disso objetivo geral do presente estudo é determinar experimentalmente a importância de compostos da família dos metil-alcanos na determinação do comportamento de agressividade de *A. muelleri*. Para isso testaremos a seguinte hipótese: formigas tratadas com compostos químicos da família dos metil alcanos irão apresentar uma maior agressividade com os indivíduos não tratados de suas próprias colônias. Além disso, vamos responder, dentre três compostos, qual ou quais metil alcanos promovem o comportamento agressivo em *A. muelleri*. As avaliações foram realizadas em uma arena e as respostas comportamentais das formigas com relação à agressividade foram analisadas. Os resultados deste trabalho ajudam a explicar que tipo de composto desencadeia a agressividade em *A. muelleri*, nos ajudando a compreender melhor o comportamento dessa espécie.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de coleta da colônias

Coletamos os indivíduos de *Cecropia glaziovii* colonizados por *Azteca muelleri* utilizados neste estudo em um fragmento florestal particular localizado no município de Coimbra (MG), às margens da BR 120/356, denominado de Mata do seu Zé (20°O 48' 48", 42°S 49' 42") (Figura 1). Segundo (ZORZAL et al., 2021), as colônias de *A. muelleri* dessa localidade apresentam comportamento de agressividade superior às formigas da mesma espécie em regiões próximas (Mata da Biologia (20° O 45' 29", 42° S 51' 55") e Mata do Paraíso (20° O 48' 05", 42° S 51' 58")), nos permitindo uma maior chance de observar as interações e as possíveis manifestações agressivas.

Figura 1 – Localização da área de coleta das colônias. Autor: Neves Jr, C. L. (2021).



A vegetação do local é classificada como Mata Atlântica (VELOSO; RANGEL-FILHO; LIMA, 1991), com precipitação anual média entre 1.300 e 1.400 mm, e temperatura anual média de 19 °C (SILVA; VIEIRA; AMARAL, 2010).

Cortamos cada planta coletada em pedaços e armazenamos em um recipiente plástico, transportando para o Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos, na

Universidade Federal de Viçosa, campus Viçosa. As colônias foram mantidas no recipiente para aclimação em temperatura ambiente (25°C) e sem contato direto com a luz solar.

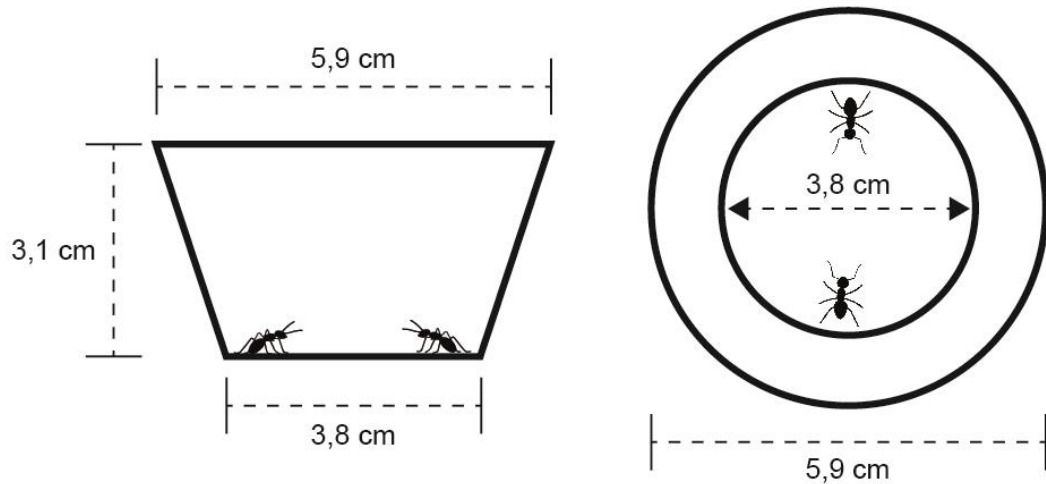
2.2 Aplicação do composto

Os compostos utilizados no experimento ocorrem naturalmente na cutícula de *A. muelleri* (DIAS et al. (2019), dados não publicados; ZORZAL et al., 2021) e foram sintetizados no Laboratório de Semioquímicos da Universidade Federal do Paraná. Os compostos são: 13-metilpentacosano (13-Me-C₂₅), 11-metilheptacosano (11-Me-C₂₇), 11-metilnonacosano (11-Me-C₂₉) e 13-metilhentriacontano (13-Me-C₃₁), utilizados em diferentes concentrações. Inserimos 1 mL da solução do composto em hexano num *vial* e utilizamos ar umidificado e filtrado com carvão (1 L / min), em temperatura ambiente, para o hexano evaporar totalmente e sobrasse apenas o composto de interesse nas paredes do *vial* (LALZAR et al., 2010). Inserimos e agitamos por cinco segundos cada formiga em um dos *vials*, a fim de criar contato entre os compostos e a cutícula da formiga. Cada formiga tratada foi mantida isolada em uma arena individual após a agitação até a execução dos testes de comportamento.

2.3 Teste de comportamento

Para a análise de comportamento, colocamos duas formigas da mesma colônia em uma arena, que consistiu de um recipiente descartável de 30mL, com 5,9 cm de abertura e 3,8 cm de fundo (Figura 2). Adicionamos uma fina camada de talco inerte puro à parede da arena para evitar a fuga das formigas (PIKART et al., 2015), além de papel filtro no fundo da arena. Os pares eram formados por (a) uma primeira formiga, sem nenhum tratamento e residente na arena, e (b) uma segunda formiga com tratamento ou não (para os casos de grupo controle) inseridas na arena. À formiga residente foi permitido o período de 5 minutos para ambientação na arena. Inserimos a segunda formiga e observamos o comportamento do par por cinco minutos. Todos os ensaios nas arenas foram filmados e analisados posteriormente.

Figura 2 – Esquema da arena utilizada no teste de comportamento. As formigas, para fins ilustrativos, não correspondem à espécie *Azteca muelleri*. Autor: Neves Jr, C. L. (2021).



2.4. Índice de agressividade

Classificamos o comportamento dos pares de formigas nas arenas seguindo uma versão modificada do ‘protocolo de agressividade’ proposto por Holway, Suarez e Case (1998) e adaptado por Giraud, Pedersen e Keller (2002), consistindo em seis níveis de interação, de 0 a 5, onde: 0, formigas se ignoram, sem contato físico e não mostram interesse; 1, antenação, toques repetidos da antena no corpo da outra formiga; 2, formigas se evitam, tomam o caminho contrário após contato com outra formiga; 3, flexão dorsal do gáster e abertura da mandíbula; 4, agressão, mordidas ou puxadas na cabeça, pernas ou outras partes do corpo e; 5, luta, agressão prolongada, prender a mandíbula em alguma parte do corpo da outra formiga, não soltando até o fim do teste.

Os níveis de 0 a 2 são considerados como comportamentos não-agressivos, e os 3-5 como comportamentos agressivos (GIRAUD; PEDERSEN, KELLER, 2002). Observados os níveis de comportamento demonstrados nas arenas, calculamos o índice de agressividade a partir da soma de vezes que cada comportamento foi realizado e dividindo esse número pelo número total de interações demonstradas nos cinco minutos de observação. Por exemplo, em um teste observou-se quatro interações nível 2 (antenação) e duas de nível 3 (flexão de gáster), logo o índice de comportamento será 2,3, pois $(4 \cdot 2 + 2 \cdot 3) / 6 = 2,3$ (ERRARD; HEFETZ, 1997; D’ETTORRE et al., 2000).

2.5. Experimento I: Testando os metil-alcanos

Para cada um dos quatro compostos (13-Me-C₂₅), 11-metilheptacosano (11-Me-C₂₇), 11-metilnonacosano (11-Me-C₂₉) e 13-metilhentriacontano (13-Me-C₃₁) utilizamos diferentes concentrações (0,25 ng/mL, 0,3 ng/mL, 0,35 ng/mL e 0,4ng/mL), formando quatro grupos para cada composto. Os valores de concentrações utilizados foram baseados em informações de Dias (2019) (dados não publicados) sobre a composição do *template* de *A. muelleri*. Testamos pares de formigas de uma mesma colônia na arena, totalizando 80 pares: 20 pares por composto e 5 pares por concentração (Figura 3).


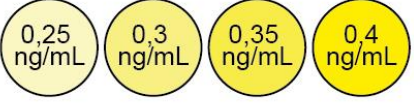



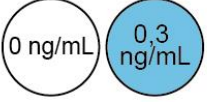
2.6. Experimento II: Encontrando a melhor concentração de 13-metilhentriacontano (13-Me-C₃₁)

Nesta etapa, utilizamos apenas 13-Me-C₃₁ nos testes em arena em decorrência dos altos índices de agressividade observados nas formigas tratadas com esse composto no Experimento I. Dividimos os pares de formigas em quatro grupos: três concentrações de 13-Me-C₃₁ (0,3 ng/mL, 3 ng/mL e 30 ng/mL) e um grupo controle (0 ng/mL), com 15 pares por grupo, totalizando 60 pares de formigas testados (Figura 3).

2.7. Experimento III: 13-metilhentriacontano (13-Me-C₃₁) como estimulador da agressividade

Utilizamos nesta etapa cinco colônias para testar a agressividade desencadeada por 13-Me-C₃₁. Testamos 20 pares de formigas por colônia, sendo 10 pares de formigas testadas com o composto na concentração de 0,3 ng/mL (tratamento) e 10 pares para o com 0 ng/mL de concentração (controle). Ao todo, testamos 100 pares de formigas em arena neste experimento (Figura 3).

Figura 3 – Esquema dos experimentos executados neste trabalho. Autor: Neves Jr, C. L. (2021).

<p>Experimento I</p>	<p>13-metilpentacosano</p>  <p>11-metilheptacosano</p>  <p>11-metilnonacosano</p>  <p>13-metilhentriacontano</p> 	<p>1 par de formiga por arena</p> <p>5 arenas por concentração = 20 arenas por composto</p> <p>Totalizando 80 arenas observadas</p>
<p>Experimento II</p>	<p>13-metilhentriacontano</p> 	<p>1 par de formiga por arena</p> <p>15 arenas por concentração + Controle</p> <p>Totalizando 60 arenas observadas</p>
<p>Experimento III</p>	<p>13-metilhentriacontano</p> 	<p>5 colônias de <i>A. muelleri</i></p> <p>20 arenas por colônia (10 Controle + 10 Composto)</p> <p>Totalizando 100 arenas observadas</p>

2.8. Análise estatística

Realizamos as análises estatísticas no software R (v. 4.0.0; R Development Core Team, 2020) por meio de análises de variância de medidas (ANOVA), seguido de análise residual para verificar a adequação das distribuições dos modelos testados. Utilizamos Modelos Lineares Generalizados (GLM) com distribuição gaussiana para verificar as diferenças nos índices de comportamento das formigas. As médias dos quadrados mínimos (LSMeans) foram usadas para comparar diferenças significativas entre os tratamentos: compostos (13-Me-C₂₅, 11-Me-C₂₇,

11-Me-C₂₉ e 13-Me-C₃₁), concentrações (0,25 ng/mL, 0,3 ng/mL, 0,35 ng/mL e 0,4ng/mL no Experimento I, e 0,3 ng/mL, 3 ng/mL, 30 ng/mL e controles nos Experimentos II e III) e plantas.

3. RESULTADOS

3.1. Experimento I: Testando os metil-alcenos

Nos 80 pares de formigas em arena, observamos interações não agressivas (71,04% das interações) e agressivas (28,96%). Antenações (nível 1) ocorreram em todos os pares e formam a maior parcela de interações (63,01%), seguidas por flexão de gáster e abertura de mandíbulas (nível 3; 28,67%), evitação (nível 2; 6,03%), ignorar (nível 0: 2%) e agressão (nível 4; 0,29%). Apenas um dos pares apresentou interações de agressão (nível 4), e não houve luta (nível 5) entre as formigas testadas na arena (Figura 4).

As concentrações usadas não promoveram diferenças significativas ($p = 0,32$) (Figura 5B), mas houve entre os compostos ($p < 0,05$). 11-Me-C₂₉ e 13-Me-C₃₁ apresentaram maiores índices de agressividade e diferiram significativamente de 11-Me-C₂₇, enquanto 13-Me-C₂₅ não apresentou diferença em relação aos demais, com o menor índice (Figura 5A).

Figura 4 – Porcentagem dos níveis de interação (0 a 5) das formigas *Azteca muelleri* observados nas arenas, para os compostos: 13-Me-C₂₅, 11-Me-C₂₇, 11-Me-C₂₉ e 13-Me-C₃₁.

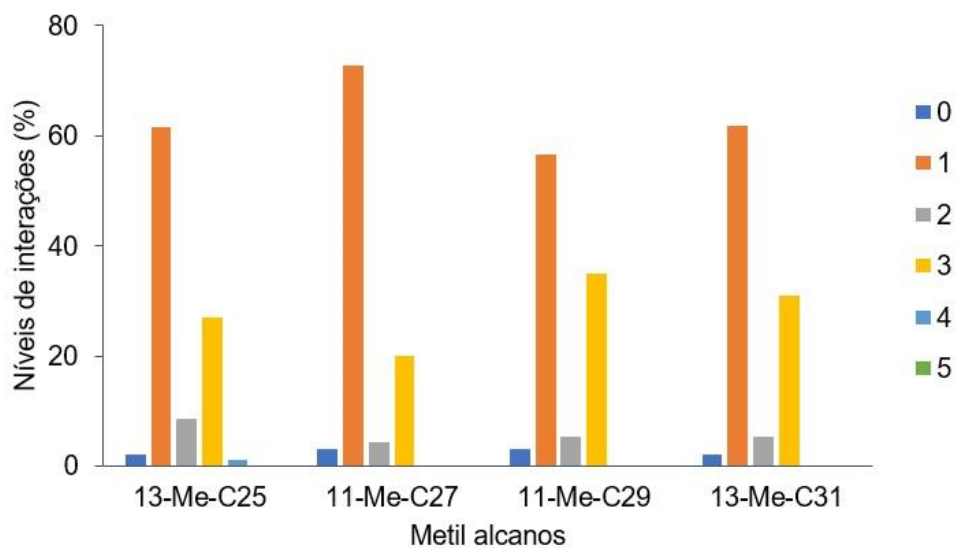
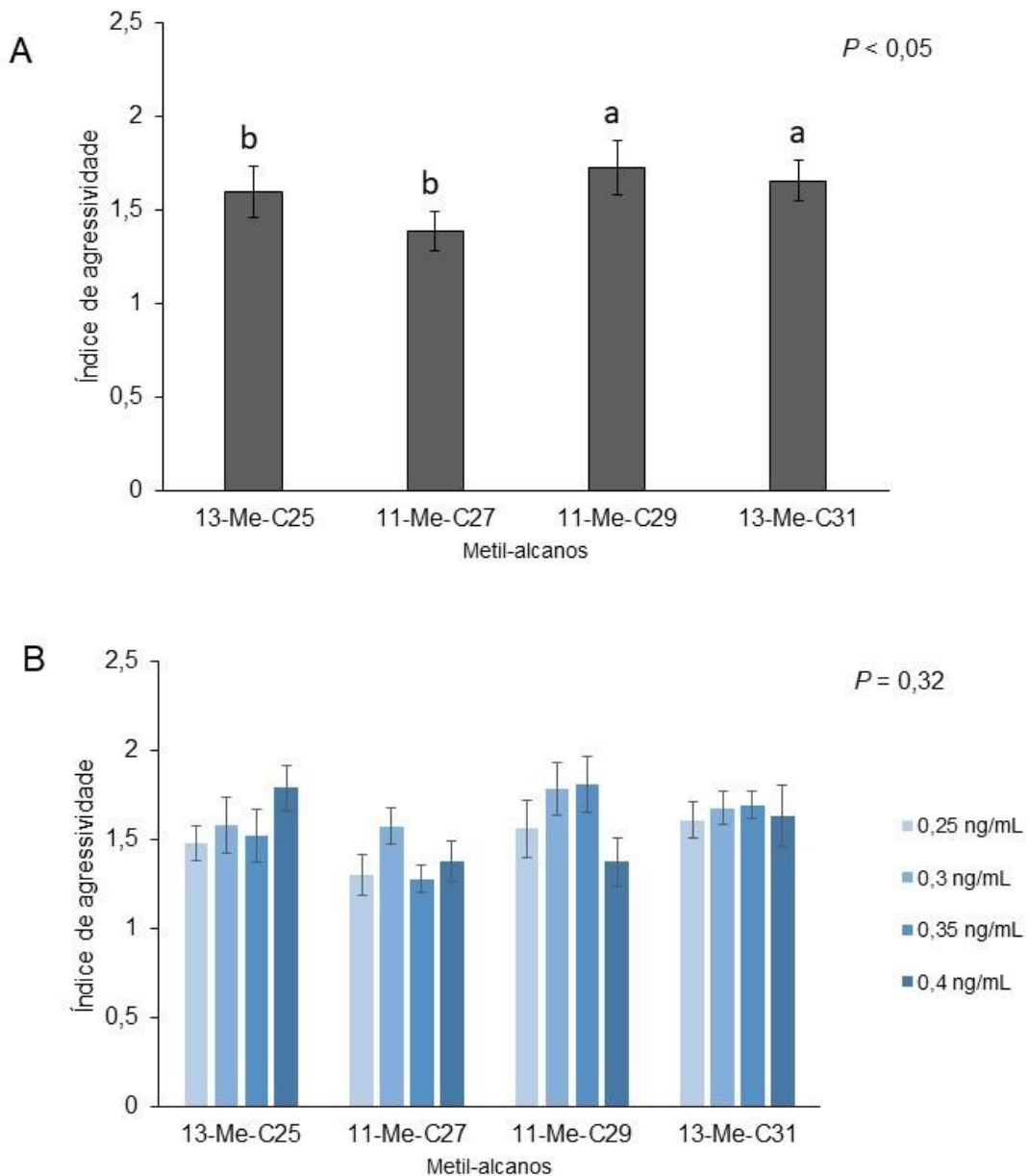


Figura 5 – Índice de agressividade das formigas *A. muelleri* para os diferentes compostos: 13-Me-C₂₅, 11-Me-C₂₇, 11-Me-C₂₉ e 13-Me-C₃₁ (A) e concentrações 0,25 ng/mL, 0,3 ng/mL, 0,35 ng/mL e 0,4ng/mL (B). As barras representam a média (\pm S.E.) e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos $P < 0,05$. Os valores de P são dados para tratamentos [modelo linear generalizado (família, Gaussiana)] seguido por comparações de pares de médias de mínimos quadrados (LSMeans).

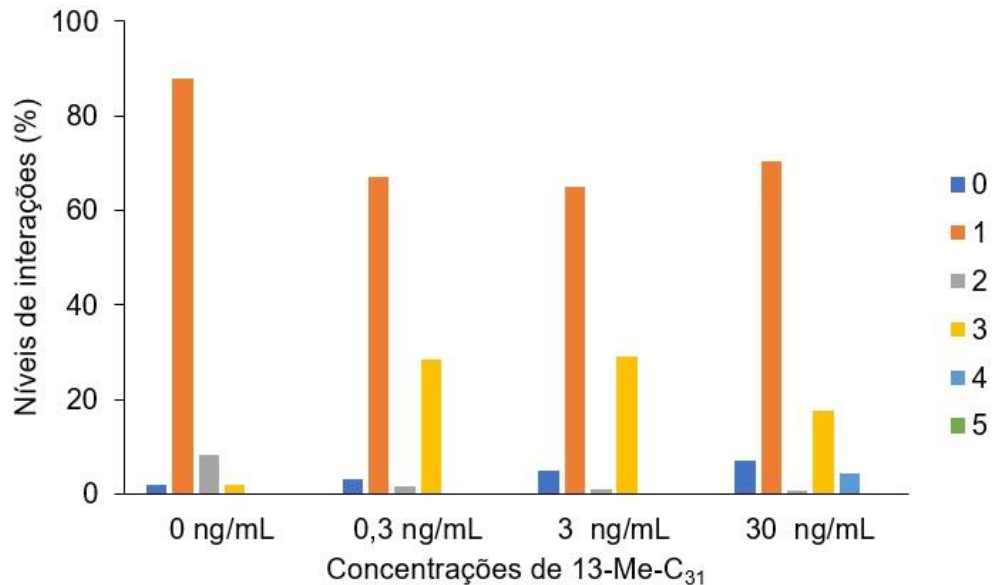


3.2. Experimento II: Encontrando a melhor concentração de 13-metilhentriacontano (13-Me-C₃₁)

Nos 60 pares de formigas em arena, foram observadas interações não agressivas (78,2% das interações) e agressivas (21,8%). Antenações (nível 1) ocorreram em todos os

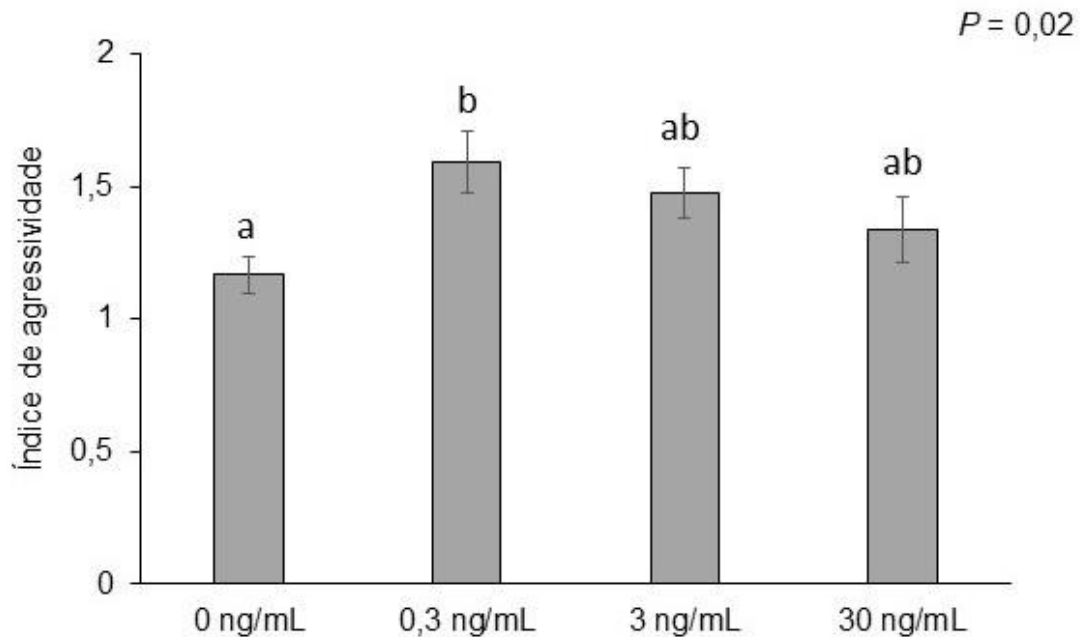
pares e, como no primeiro experimento, compuseram a maior parcela de interações (73,5%), seguidas por flexão de gáster e abertura de mandíbulas (nível 3; 17,6%), agressão (nível 4; 4,2%), ignorar (nível 0; 4%) e evitação (nível 2; 0,7%). Não houve luta (nível 5) entre as formigas testadas na arena (Figura 6).

Figura 6 – Porcentagem dos níveis de interação (0 a 5) das formigas *Azteca muelleri* observados nas arenas, para o composto 13-Me-C₃₁.



Dentre as diferentes concentrações de 13-Me-C₃₁ testadas, apenas os tratamentos com concentração 0,3 ng/mL revelaram diferença significativa ($p = 0,02$), sendo o tratamento com maiores índices de agressividade (Figura 7).

Figura 7 – Índices de agressividade das formigas *Azteca muelleri* observados em cada um dos tratamentos (0 ng/mL, 0,3 ng/mL, 3 ng/mL e 30 ng/mL) realizados com 13-Me-C₃₁. As barras representam a média (\pm S.E.) e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Os valores de P são dados para tratamentos [modelo linear generalizado (família, Gaussiana)] seguido por comparações de pares de médias de mínimos quadrados (LSMeans).



3.3. Experimento III: 13-metilhentriacontano (13-Me-C₃₁) como estimulador da agressividade

Nos 100 pares de formigas em arena, foram observadas interações não agressivas (71,1% das interações) e agressivas (28,9%). Antenações (nível 1) ocorreram em todos os pares e formam a maior parcela de interações (63,1%). Em arenas com formigas tratadas com 13-Me-C₃₁, o tempo de duração das antenações foi prolongado. Seguindo a ordem, flexão de gáster e abertura de mandíbulas (nível 3; 28,9%), evitação (nível 2; 5,9%) e ignorar (nível 0; 2%). Não houve agressão (nível 4) e luta (nível 5) entre as formigas testadas neste experimento (Figura 8). Os pares com formigas tratadas com 13-Me-C₃₁ apresentaram maior agressividade que os pares controle ($p < 0,001$) (Figura 9).

Figura 8 – Porcentagem dos níveis de interação (0 a 5) das formigas *Azteca muelleri* observados nas arenas com plantas diferentes, para o composto 13-Me-C₃₁.

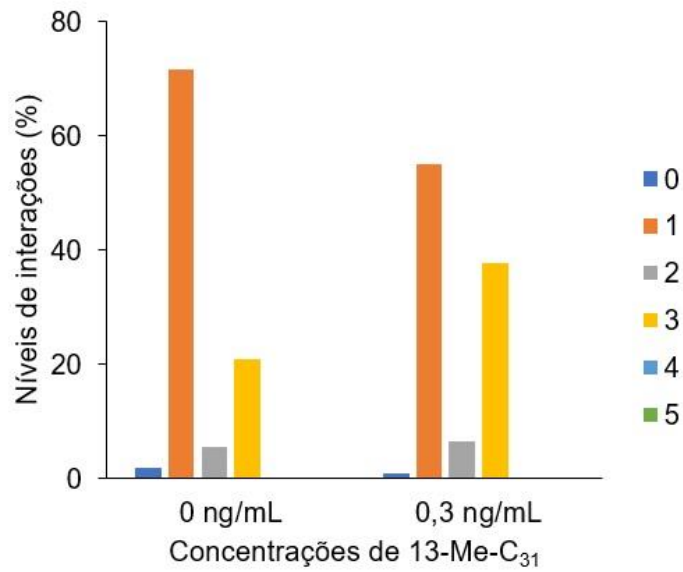
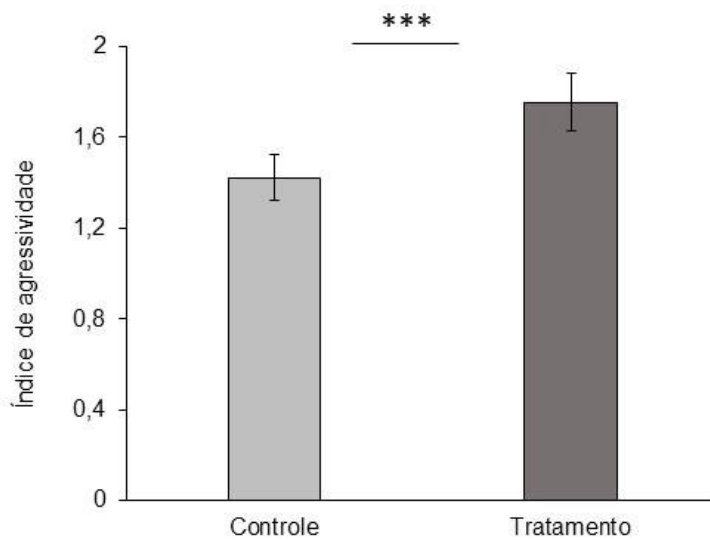


Figura 9 – Índices de agressividade das formigas *Azteca muelleri* observados no controle (0 ng/mL) e no tratamento com 0,3 ng/mL de 13-Me-C₃₁. As barras representam a média (\pm S.E.) e o asterisco indica a diferença entre os tratamentos ($P < 0,001$). Os valores de P são dados para tratamentos [modelo linear generalizado (família, Gaussiana)].



4. DISCUSSÃO

Dos quatro metil-alcanos testados (13-Me-C₂₅, 11-Me-C₂₇, 11-Me-C₂₉ e 13-Me-C₃₁), 11-Me-C₂₉ e 13-Me-C₃₁ apresentaram os maiores índices de agressividade. Observamos também que a concentração de 0,3 ng/mL de 13-Me-C₃₁ proporcionou um estranhamento entre as formigas da mesma colônia de *Azteca muelleri*, não necessariamente apresentando comportamentos agressivos, mas uma grande frequência de antenações e evitações, com poucas flexões de gáster e uma baixíssima frequência de agressões.

Antenações estiveram presentes em todos os testes e compuseram a maioria das interações observadas. Sendo uma interação básica e essencial na troca de informações entre companheiras e recrutamento (DETRAIN; DENEUBOURG; PASTEELS, 1999; OZAKI et al., 2005; VANDER MEER et al., 2019), esse contato táctil caracteriza uma comunicação amigável e de reconhecimento (D'ETTORRE et al., 2000). Em estudos com modificação da assinatura cuticular intracolônia, o tempo de reconhecimento mediado por antenações é prolongado, uma vez que a formiga não reconhece de imediato seu companheiro (CARLIN; HÖLLDOBLER, 1986; DAHBI; LENOIR, 1998; PROVOST et al., 1993; VANDER MEER; SALIWANCHIK; LAVINE, 1989). Neste estudo, alguns dos pares tratados com metil-alcanos apresentaram tempo prolongado de antenação.

No que diz respeito às interações agressivas, a flexão dorsal de gáster esteve presente na maior parte dos testes em arena, com menor presença nas arenas controle. O comportamento de flexão dorsal do gáster indica defesa química (GIRAUD; PEDERSEN, KELLER, 2002), e nos testes realizados, a presença desse comportamento aponta para a percepção das formigas a uma mistura de hidrocarbonetos alterado ou até mesmo para uma falha no reconhecimento do seu companheiro de ninho. Além da flexão dorsal de gáster, o comportamento agressivo presente, ainda que com baixa frequência, foi a agressão, onde a formiga não tratada agrediu a tratada com mordidas. Para isso, podemos inferir que o composto causa uma mudança no *template*, mas não a ponto de provocar maiores agressões entre as formigas. De forma geral, não é possível garantir que o reconhecimento de companheiros seja um processo perfeito, pois o *template* nem sempre se apresenta de forma consistente, residindo nessa questão um dos pontos fracos da defesa da colônia (BARBERO, 2016).

13-Me-C₃₁ é encontrado na cutícula de outras espécies de formigas, como *Linepithema humile* (MOTHAPO; WOSSLER, 2011), *Formica argentea* (WŁODARCZYK; SZCZEPANIAK, 2014), *F. sanguinea* e *F. rufa* (KRASNEC; BREED, 2013), mas seus envolvimento específicos nesses organismos não são precisamente definidos. A função de 13-Me-C₃₁ enquanto desencadeador de agressividade entre formigas é pouquíssimo explorada,

sendo descrito como componente cuticular de outros insetos como um cairomônio (JONES, 1971). As colônias de *A. muelleri* aqui tratadas com 13-Me-C₃₁ apresentaram uma maior frequência de comportamentos de antenação e evitamento quando comparada com ninhos não tratados. Assim, apesar de não podermos afirmar que esse composto desencadeou comportamentos agressivos, ele causa um evidente estranhamento entre indivíduos da mesma colônia, evidenciando que o mesmo tem uma importante função de reconhecimento entre colônias de ninhos diferentes, como sugerido por Zorzal et al. (2021).

Apesar de apresentar índices significativos de agressividade em nossos experimentos, 11-Me-C₂₉ não é descrito em outras espécies como promotor de agressividade, como em *Camponotus floridanus*, onde é indicador de fertilidade nas rainhas (ENDLER et al., 2004). Esse composto está presente na cutícula de outras espécies, como *Formica argentea* (KRASNEC; BREED, 2013), *Odontomachus haematodus* e *O. ruginodis* (SMITH; MILLAR; SUAREZ, 2016).

O menor índice de agressividade foi observado nas arenas com 13-Me-C₂₅. Na formiga *Neoponera apicalis*, esse composto atua como regulador de atividades reprodutivas, com proporções diferentes para rainhas e operárias. Em testes de manipulação da quantidade de 13-Me-C₂₅, semelhantes aos realizados aqui, menos interações agonísticas foram observadas, sinalizando um “status maior” de quem possui o composto (YAGOUND et al., 2014, 2015). É possível que comportamento parecido tenha acontecido no presente estudo, resultando em menor agressividade. O composto é encontrado também em *Formica rufa* (WŁODARCZYK; SZCZEPANIAK, 2014) e *Wasmannia auropunctata* (VONSHAK et al., 2009), dentre outras espécies.

É válido ressaltar que experimentos realizados em laboratório são tentativas de uma representação fiel biológica, principalmente quando estamos falando de questões comportamentais. A mensuração desses comportamentos é quase sempre realizada, ainda assim, em laboratório, e são essenciais para investigar as nuances do comportamento de reconhecimento de companheiros de ninho (HOWARD; BLOMQUIST, 2005), considerando também que os insetos podem realizar comportamentos sem uma resposta aparente para nós, os observadores, e até mesmo preenchendo diferentes espaços entre o comportamento binário de agressividade ou não-agressividade (HEFETZ et al., 1996; BREED, 2003; NEWAY; ROBSON; CROZIER, 2010).

Os índices de agressividade aqui utilizados seguem o ‘protocolo de agressividade’ proposto por Holway, Suarez e Case (1998) e adaptado por Giraud, Pedersen e Keller (2002), consistindo em seis níveis de interação, de 0 a 5. Há outras metodologias de mensuração de

comportamento adotadas em diferentes estudos, abrangendo mais ou menos nuances de comportamento e aplicadas a outras espécies de formigas (CARLIN; HÖLLDOBLER, 1986; ERRARD; HEFETZ, 1997; SUAREZ et al., 1999; ROULSTON; BUCZKOWSKI; SILVERMAN, 2003; PACHECO; DEL-CLARO, 2015; LEBRUN et al., 2019). A adoção de diferentes métodos fortalece a ideia de que as interações entre esses insetos são diversas, e a escolha deve se basear de acordo com as particularidades da espécie em estudo (KRAPF et al., 2019). Para fins de comparação e com anseio de que haja uma padronização nos futuros estudos comportamentais com *A. muelleri*, o método utilizado aqui é o mesmo adotado por Zorzal et al. (2021) em trabalho com esta espécie. Como há poucos trabalhos investigando o comportamento dessa espécie, utilizar um método com muitos níveis de interação parece ser o ideal, uma vez que as nuances comportamentais podem ser melhor observadas, exploradas e, enfim, resultar no aprimoramento do método de avaliação.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados neste trabalho colaboram para o entendimento de uma ação de extrema importância para a sobrevivência da colônia: a agressividade. As colônias de *A. muelleri* testadas não tiveram reações agressivas, mas apresentaram estranhamento quanto aos companheiros de ninho tratados com 13-metilhentriacontano. Concluímos que esse composto tem uma importante função no reconhecimento entre colônias nessa espécie. As observações com 11-metilnonacosano também indicam estranhamento, mas sugerimos que novos estudos acerca de seus efeitos no comportamento dessa espécie sejam realizados, tratando também dos demais compostos aqui utilizados. Enquanto parte de um sistema mutualístico, estudos sobre o comportamento das formigas *A. muelleri* nos ajudam a compreender não apenas seus meios de comunicação, como também as configurações de sua relação sua planta hospedeira, *Cecropia glaziovii*.

REFERÊNCIAS

- BARBERO, F. Cuticular lipids as a cross-talk among ants, plants and butterflies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1966, p. 1-19, 2016. DOI: 10.3390/ijms17121966.
- BOS, N.; D'ETTORRE, P. Recognition of social identity in ants. **Frontiers in Psychology**, v. 3, n. 83, p. 1-6, 2012. DOI: 10.3389/fpsyg.2012.00083.
- BOULAY, R.; KATZAV-GOZANSKY, T.; HEFETZ, A.; LENOIR, A. Odour convergence and tolerance between nestmates through trophallaxis and grooming in the ant *Camponotus fellah* (Dalla Torre). **Insectes Sociaux**, v. 51, n. 1, p. 55-61, 2004. DOI:10.1007/s00040-003-0706-0.
- BREED, M. D. Nestmate recognition assays as a tool for population and ecological studies in eusocial insects: a review. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 76, n. 4, p. 539-550. 2003.
- CARLIN, N. F.; HÖLLDOBLER, B. The kin recognition system of Carpenter ants (*Camponotus* spp.). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 19, p. 123-134, 1986.
- CARNEIRO, M. A. F.; GAGLIOTI, A. L.; CARVALHO, K. S.; NASCIMENTO, I. C.; ANDZINA, J. The habitat affects the ecological interactions between *Azteca Forel* (Hymenoptera: Formicidae) and *Cecropia Loefl.* (Urticaceae Juss.). **Sociobiology**, v. 65, n. 2, p. 177-184, 2018. DOI: 10.13102/sociobiology.v65i2.2044.
- CROZIER, R.; DIX, M. Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social Hymenoptera. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 4, n. 3, p. 217-224, 1979.
- DAHBI, A.; LENOIR, A. Nest separation and the dynamics of the gestalt odor in the polydomous ant *Cataglyphis iberica* (Hymenoptera, Formicidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 42(5):349–355, 1998.
- DETRAIN, C.; DENEUBOURG, J. L.; PASTEELS, J. M. (ed.) **Information processing in social insects**. Basel: Springer Science & Business Media, 1999
- D'ETTORRE, P.; ERRARD, C.; IBARRA, F.; FRANCKE, W.; HEFETZ, A. Sneak in or repel your enemy: Dufour's gland repellent as a strategy for successful usurpation in the slave-maker *Polyergus rufescens*. **Chemoecology**, v. 10, p. 135-142, 2000. DOI: 10.1007/PL00001815.
- ENDLER, A.; LIEBIG, J.; SCHMITT, T.; PARKER, J. E.; JONES, G. R.; SCHREIER, P.; HÖLLDOBLER, B. Surface hydrocarbons of queen eggs regulate worker reproduction in a social insect. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 9, p. 2945-2950, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0308447101>.
- ERRARD, C.; HEFETZ, A. Label familiarity and discriminatory ability of ants reared in mixed groups. **Insectes Sociaux**, v. 44, p. 189-198, 1997.
- FERGUSON, S. T.; PARK, K. Y.; RUFF, A. A.; BAKIS, I.; ZWIEBEL, L. J. Odor coding of nestmate recognition in the eusocial ant *Camponotus floridanus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 223, n. 2, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.215400>.
- GIRAUD, T.; PEDERSEN, J. S.; KELLER, L. Evolution of supercolonies: the Argentine ants of Southern Europe. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 9, p. 6075-6079, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.092694199>.
- GREENE, M. J.; GORDON, D. M. Cuticular hydrocarbons inform task decisions. **Nature**, v. 423, p. 32-32, 2003.
- HEFETZ, A.; ERRARD, C.; CHAMBRIS, A.; LE NEGRATE, A. Postpharyngeal gland secretion as a modifier of aggressive behavior in the Myrmicine ant *Manica rubida*. **Journal of Insect Behavior**, v. 9, p. 709-717, 1996.

- HEIL, M.; MCKEY, D. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 34, n. 1, p. 425-553, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132410>.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. (ed.) **The Ants**. EUA: Harvard University Press, 1990.
- HOLWAY, D. A.; SUAREZ, A. V.; CASE, T. J. Loss of intraspecific aggression in the success of a widespread invasive social insect. **Science**, v. 282, n. 5390, p. 949-952, 1998. DOI: [10.1126/science.282.5390.949](https://doi.org/10.1126/science.282.5390.949).
- HOWARD, R. W.; BLOMQUIST, G. J. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 371-393, 2005. DOI: [10.1146/annurev.ento.50.071803.130359](https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130359).
- JONES, R. L.; LEWIS, W.; BOWMAN, M. C.; BEROZA, M.; BIERL, B. A. Host-seeking stimulant for parasite of corn earworm: Isolation, identification, and synthesis. **Science**, v. 173, n. 3999, p. 842-843, 1971. DOI: [10.1126/science.173.3999.842](https://doi.org/10.1126/science.173.3999.842)
- KRAPF, P.; HOCHENEGGER, N.; ARTHOFER, W.; SCHLICK-STEINER, B. C.; STEINER, F. M. Comparing ant behaviour indices for fine-scale analyses. **Scientific Reports**, v. 9, n. 6856, p. 1-14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43313-4>.
- KRASNEC, M. O.; BREED, M. D. Colony-specific cuticular hydrocarbon profile in *Formica argentea* ants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 1, p. 59-66, 2013. DOI: [10.1007/s10886-012-0227-2](https://doi.org/10.1007/s10886-012-0227-2).
- LALZAR, I.; SIMON, T.; VANDER MEER, R.; HEFETZ, A. Alteration of cuticular hydrocarbon composition affects heterospecific nestmate recognition in the carpenter ant *Camponotus fellah*. **Chemoecology**, v. 20, n. 1, p. 19-24, 2010. DOI: [10.1007/s00049-009-0030-x](https://doi.org/10.1007/s00049-009-0030-x).
- LEBRUN, E. G.; PLOWES, R. M.; FOLGARAIT, P. J.; BOLLAZZI, M.; GILBERT, L. E. Ritualized aggressive behavior reveals distinct social structures in native and introduced range Tawny Crazy ants. **PLOS ONE**, v. 14, n. 11, p. e0225597, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225597>.
- LENOIR, A.; D'ETTORRE, P.; ERRARD, C.; HEFETZ, A. Chemical ecology and social parasitism in ants. **Annual Review of Entomology**, v. 46, n. 1, p. 573-599, 2001. DOI: [10.1146/annurev.ento.46.1.573](https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.573).
- MARTIN, S.; DRIJFHOUT, F. A review of ant cuticular hydrocarbons. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 10, p. 1151-1161, 2009. DOI: [10.1007/s10886-009-9695-4](https://doi.org/10.1007/s10886-009-9695-4).
- MOTHAPO, N. P.; WOSSLER, T. C. Behavioural and chemical evidence for multiple colonisation of the Argentine ant, *Linepithema humile*, in the Western Cape, South Africa. **BMC Ecology**, v. 11, n. 6, p. 1-11, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6785-11-6>.
- NEUMANN, K. M.; PINTER-WOLLMAN, N. Collective responses to heterospecifics emerge from individual differences in aggression. **Behavioral Ecology**, v. 30, n. 3, p. 801-808, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/beheco/arp017>.
- NEWAY, P. S.; ROBSON, S. K.; CROZIER, R. H. Know thine enemy: why some Weaver ants do but others do not. **Behavioral Ecology**, v. 21, n. 2, p. 381-386, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/beheco/arp201>.
- NUNES, T. M.; NASCIMENTO, F. S.; TURATTI, I. C.; LOPES, N. P.; ZUCCHI, R. Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? **Animal Behaviour**, v. 75, n. 3, p. 1165-1171, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2007.08.028>.
- OLIVEIRA, K. N.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A.; KAMINSKI, L. A.; MOREIRA, M. Z.; CAMPOS, R. I. The effect of symbiotic ant colonies on plant growth: a test using a *Azteca-Cecropia* system. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120351, 2015. DOI: [10.1371/journal.pone.0120351](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120351).

- OZAKI, M.; WADA-KATSUMATA, A.; FUJIKAWA, K.; IWASAKI, M.; YOKOHARI, F.; SATOJI, Y.; NISIMURA, T.; YAMAOKA, R. Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. **Science**, v. 309, n. 5732, p. 311-314, 2005. DOI: 10.1126/science.1105244.
- PACHECO, P. S.; DEL-CLARO, K. Nestmate recognition in the Amazonian Myrmecophyte Ant *Pseudomyrmex concolor* Smith (Hymenoptera, Formicidae). **Sociobiology**, v. 62, n. 3, p. 356-363, 2015. DOI: 10.13102/sociobiology.v62i3.746.
- PIKART, T. G.; LEMES, P. G.; MORAIS, W. C. C.; ZANUNCIO, J. C.; DELLA LUCIA, T. M. C. Recognition and aggression of conspecific and heterospecific worker in *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 62, n. 1, p. 28-33, 2015. DOI: <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v62i1.28-33>.
- PROVOST, E.; RIVIERE, G.; ROUX, M.; MORGAN, E. D.; BAGNERES, A. G. Change in the chemical signature of the ant *Leptothorax lichtensteini* Bondroit with time. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 23, n. 8, p. 945-957, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(93\)90112-6](https://doi.org/10.1016/0965-1748(93)90112-6)
- RICKSON, F. R. Anatomical development of the leaf trichilium and Müllerian bodies of *Cecropia peltata* L. **American Journal of Botany**, v. 63, n. 9, p. 1266-1271, 1976. DOI: <https://doi.org/10.2307/2441742>.
- ROULSTON, T.; BUCZKOWSKI, G.; SILVERMAN, J. Nestmate discrimination in ants: effect of bioassay on aggressive behavior. **Insectes Sociaux**, v. 50, p. 151-159, 2003. DOI 10.1007/s00040-003-0624-1.
- SANO, K.; BANNON, N.; GREENE, M. J. Pavement ant workers (*Tetramorium caespitum*) assess cues coded in cuticular hydrocarbons to recognize conspecific and heterospecific non-nestmate ants. **Journal of Insect Behavior**, v. 31, p. 186-199, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10905-017-9659-4>.
- SILVA, C. A.; VIEIRA, M. F.; AMARAL, C. H. Floral attributes, ornithophily and reproductive success of *Palicourea longepedunculata* (Rubiaceae), a distylous shrub in Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 2, p. 207-213, 2010. DOI:10.1590/S0100-84042010000200002.
- SMITH, A. A.; MILLAR, J. G.; SUAREZ, A. V. Comparative analysis of fertility signals and sex-specific cuticular chemical profiles of *Odontomachus* Trap-jaw ants. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 419-430, 2016. DOI: 10.1242/jeb.128850.
- STURGIS, S. J.; GORDON, D. M. Nestmate recognition in ants (Hymenoptera: Formicidae): a review. **Myrmecological News**, v. 16, p. 101-110, 2012.
- SUAREZ, A. V.; TSUTSUI, N. D.; HOLWAY, D. A.; CASE, T. J. Behavioral and genetic differentiation between native and introduced populations of the Argentine ant. **Biological Invasions**, v. 1, p. 43-53, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1010038413690>.
- VANDER MEER, R. K.; BREED, M. D.; WINSTON, M.; ESPELIE, K. E. (ed.) **Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites**. Nova York: Routledge, 2019.
- VANDER MEER, R. K.; SALIWANCHIK, D.; LAVINE, B. Temporal changes in colony cuticular hydrocarbon patterns of *Solenopsis invicta*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, n. 7, p. 2115-2125, 1989. DOI:10.1007/BF01207442.
- VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, 1991.
- VONSHAK, M.; DAYAN, T.; FOUCAUD, J.; ESTOUP, A.; HEFETZ, A. The interplay between genetic and environmental effects on colony insularity in the clonal invasive Little Fire ant *Wasmannia auropunctata*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 63, p. 1667-1677, 2009. DOI: 10.1007/s00265-009-0775-9.

WŁODARCZYK, T.; SZCZEPANIAK, L. Incomplete homogenization of chemical recognition labels between *Formica sanguinea* and *Formica rufa* ants (Hymenoptera: Formicidae) living in a mixed colony. **Journal of Insect Science**, v. 14, n. 214, p. 1-14, 2014. DOI: 10.1093/jisesa/ieu076.

YAGOUND, B.; BLACHER, P.; FRESNEAU, D.; POTEAUX, C.; CHÂLINE, N. Status discrimination through fertility signalling allows ants to regulate reproductive conflicts. **Animal Behaviour**, v. 93, p. 25-35, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.04.014>.

YAGOUND, B.; GOUTTEFARDE, R.; LEROY, C.; BELIBEL, R.; BARBAUD, C.; FRESNEAU, D.; CHAMERON, S.; POTEAUX, C.; CHÂLINE, N. Fertility signaling and partitioning of reproduction in the ant *Neoponera apicalis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, p. 557-566, 2015. DOI: 10.1007/s10886-015-0591-9.

ZORZAL, G.; CAMAROTA, F.; DIAS, M.; VIDAL, D. M.; LIMA, E.; FREGONEZI, A.; CAMPOS, R. I. The dear enemy effect drives conspecific aggressiveness in an Azteca-Cecropia system. **Scientific Reports**, v. 11, n. 6158, p. 1-10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85070-3>.