

CIDÁLIA GABRIELA SANTOS MARINHO

**RESPOSTA COMPORTAMENTAL DE FORMIGAS CORTADEIRAS AO
SESQUITERPENO β -EUDESMOL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M338r
2006

Marinho, Cidália Gabriela Santos, 1972-
Resposta comportamental de formigas cortadeiras
ao sesquiterpeno β -eudesmol / Cidália Gabriela Santos
Marinho. – Viçosa : UFV, 2006.
x, 63f. : il. ; 29cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Terezinha Maria Castro Della Lucia.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Formiga-cortadeira - Comportamento. 2. Feromonas.
3. Sesquiterpenos. I. Universidade Federal de Viçosa.
II.Título.

CDD 22.ed. 595.796159

CIDÁLIA GABRIELA SANTOS MARINHO

RESPOSTA COMPORTAMENTAL DE FORMIGAS CORTADEIRAS AO
SESQUITERPENO β -EUDESMOL

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2006.

Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes
(Conselheiro)

Prof. Eraldo Rodrigues de Lima
(Conselheiro)

Prof. Marcelo Coutinho Picanço

Prof. Márcio da Silva Araújo

Prof^a. Terezinha Maria Castro Della Lucia
(Orientador)

Aos meus queridos pais, Hygino Castílio e Maria de Lourdes,
pelo apoio e pelo empenho em me oferecer uma boa
educação.

DEDICO

Ao meu esposo Marcos Fadini, pelo amor, paciência e
companheirismo.

OFEREÇO

A Deus, pela vida e pela força nos momentos de dificuldade.

AGRADEÇO

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Biologia Animal pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof^{ta}. Terezinha M. C. Della Lucia, pela amizade, pela orientação e pelas inúmeras oportunidades oferecidas no decorrer destes 12 anos.

Ao Dr. Jacques H. C. Delabie por me apresentar ao mundo das formigas.

Ao Prof. Raul N. C. Guedes, pelas discussões, sugestões e ensinamentos.

Ao Prof. Eraldo R. Lima pelas sugestões.

A Myriam M. R. Ribeiro (Myrinha) pela amizade, força e ajuda indispensável à realização deste trabalho.

Ao Dr. Sérgio Tinoco, pela paciência e indispensável ajuda na parte química do trabalho.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Entomologia, pela contribuição à minha formação acadêmica.

Aos meus colegas de curso pela convivência, amizade e coleguismo.

A secretária do curso de Pós-Graduação em Entomologia (UFV), Maria Paula A. da Costa, pela paciência, compreensão, ajuda e amizade durante todos estes anos.

Aos meus amigos da Entomologia, Adrian, Cléa, Cláudia, Claudinei, Hamilton, João, Paula, Ivan, Romero pelo convívio e companheirismo.

Ao pessoal do Insetário, Alice, Ethel, Fabrícia, Ilka, Lucas, Marco, Márcio, Marcy, Robson, Sr. Manoel pelos momentos alegres, difíceis e pela colaboração e serviços prestados.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

CIDÁLIA GABRIELA SANTOS MARINHO, filha de Hygino Castílio Nunes Marinho e Maria de Lourdes Santos Marinho, nasceu em Itabuna, Bahia, em 4 de maio de 1972.

Em outubro de 1998, concluiu o curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em abril de 1999, ingressou no curso de Mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Lavras, defendendo tese em 23 de fevereiro de 2001.

Em março de 2002, iniciou o curso de doutorado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 24 de fevereiro de 2006.

Através de concurso público, em dezembro de 2004, ingressou como Professora Substituta no Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, lecionando para a graduação, a disciplina Entomologia Geral.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
CAPÍTULO 1: β -eudesmol-induced aggression in the leaf-cutting ant <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	10
Abstract.....	10
Introduction.....	11
Materials and Methods.....	13
Results.....	15
Discussion.....	17
References.....	20
CAPÍTULO 2: Aggressive response of pest ant species (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) to β -eudesmol.....	27
Abstract.....	27
Introduction.....	28
Materials and Methods.....	29
Results.....	31
Discussion.....	33
References.....	36

CAPÍTULO 3: Modo de atuação do β -eudesmol na indução da agressividade entre companheiras de ninho de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	41
Resumo.....	41
Introdução.....	42
Materiais e Métodos.....	44
Resultados.....	49
Discussão.....	51
Referências.....	55
2. CONCLUSÕES GERAIS.....	62

RESUMO

MARINHO, Cidália Gabriela Santos, D. S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006.
Resposta comportamental de formigas cortadeiras ao sesquiterpeno β -eudesmol.
Orientadora: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Conselheiros: Raul Narciso Carvalho Guedes e Eraldo Rodrigues de Lima.

Trabalhos com folhas de *Eucalyptus maculata* e com o sesquiterpeno β -eudesmol, extraído de suas folhas e oferecidos em áreas de forrageamento, de colônias de *Atta sexdens rubropilosa*, promoveram alterações comportamentais entre as companheiras de ninho. Essas alterações foram caracterizadas por inspeção e mordidas em diferentes regiões do corpo, com mutilação e até morte. Com base nisso, este trabalho objetivou avaliar o efeito do β -eudesmol, adquirido comercialmente, em colônias de formigas cortadeiras. Os estudos foram realizados em colônias de laboratório, no Insetário do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em salas sob a temperatura de $25\pm 5^{\circ}\text{C}$, $75\pm 10\%$ U. R., e 12:12 (L:D). Foram utilizadas colônias pequenas (1,5L de jardim de fungo) e grandes (25,0L de jardim de fungo) de *Atta sexdens rubropilosa*, colônias de *A. laevigata*, *A. bisphaerica*, *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *Ac. subterraneus molestans* com volume de fungo entre 5,0 e 6,0L e, ainda, colônias de *Solenopsis invicta*. Os bioensaios realizados nas colônias consistiam no oferecimento de fragmentos de papel filtro impregnados com: o β -eudesmol (tratamento), com o solvente utilizado nas diluições do produto (controle) e somente papel-filtro (branco), nas arenas de forrageamento simultaneamente. Numa primeira etapa, verificou-se que o β -eudesmol desencadeou a agressão entre companheiras de ninho, com maior intensidade em colônias grandes do que nas pequenas. Esta alteração comportamental foi caracterizada por inspeção, mordidas nas pernas, abdome e cabeça, com mutilações e morte. Numa segunda etapa, verificou-

se que o produto promove comportamento agressivo somente em colônias de formigas do gênero *Atta*, sendo que dentre as três espécies desse gênero estudadas, *A. sexdens rubropilosa* foi a que demonstrou maior agressividade entre as companheiras de ninho. O β -eudesmol não provocou qualquer efeito quando foram realizadas aplicações tópicas nas operárias. Na terceira parte deste trabalho, procurou-se demonstrar o modo de ação do β -eudesmol. Para isso, foram realizadas bioensaios com formigas liberando ou não o feromônio de alarme, e em contato com o β -eudesmol, com base na hipótese de que o produto sinergiza o feromônio de alarme. Também efetuaram-se análises químicas da cutícula das operárias que tiveram contato com o produto, fundamentadas na hipótese de modificação da cutícula, do odor individual e conseqüentemente não reconhecimento de companheiras de ninho. Os resultados obtidos evidenciaram que o β -eudesmol interfere tanto no sistema de alarme, quanto no de reconhecimento de companheiras de ninho. Estes resultados sugerem que o β -eudesmol é uma substância que promove a quebra da coesão das colônias e isto ocorre em conseqüência da falta de reconhecimento das companheiras de ninho que possivelmente está associada a modificação da composição da cutícula das formigas juntamente com a ação no sistema de alarme.

ABSTRACT

MARINHO, Cidália Gabriela Santos, D. S. Universidade Federal de Viçosa, february of 2006.
Behavioral response of leaf-cutting ants to the sesquiterpene β -eudesmol. Adviser:
Terezinha Maria Castro Della Lucia. Committee members: Raul Narciso Carvalho Guedes e
Eraldo Rodrigues de Lima.

A previous research with the sesquiterpene β -eudesmol extracted from leaves of *Eucalyptus maculata* nest and offered to ants at their foraging arenas at the nest showed that it induced behavioral modifications among nestmates of *Atta sexdens rubropilosa*. These alterations were characterized by inspection and bites at different body parts of a contaminated ant, with mutilation and even death. Based on these findings, this research aimed at evaluating the effect of the synthetic commercial β -eudesmol on colonies of leaf-cutting ants. The studies were conducted in laboratory colonies at the Insectary of the Animal Biology Department of the Federal University of Viçosa (UFV). Room conditions were: $25\pm 5^{\circ}\text{C}$, $75\pm 10\% \text{R.H.}$ and 12:12 (L:D). Small (1.5L of fungus garden) and large colonies (25.0L of fungus garden) of *Atta sexdens rubropilosa*, of *A. laevigata* and of *A. bisphaerica*; colonies of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and *Ac. subterraneus molestans* (fungus volume between 5.0 and 6.0L) and colonies of *Solenopsis invicta* were used to conduct the bioassays. They consisted of simultaneously offering, at the foraging arenas, filter paper fragments impregnated with either β -eudesmol (treatment), with the solvent used in the product dilutions (control) or only the filter-paper fragment (blank). β -eudesmol induced aggression among nestmates, the reaction being stronger in larger colonies and characterized by inspection, biting of legs, abdomen and head, followed by mutilation and death. In a second step, it was verified that the substance promoted aggression only in colonies of *Atta*, with strongest effects on *A. sexdens rubropilosa*. β -eudesmol

did not elicit reactions when its application was topic on the workers. On the last part of the research, the mode of action of β -eudesmol was investigated. Bioassays were conducted in ants able or unable to release alarm pheromone and in contact with the product. These bioassays were based on the hypothesis that the product synergizes the alarm pheromone. Furthermore, chemical analyses were performed on the cuticle of workers that had previous contact with β -eudesmol. The hypothesis was that a possible chemical modification of the cuticle resulted on interference with the individual odor and, therefore, on nestmate recognition. The results revealed that β -eudesmol interferes with both the alarm system and the recognition system of nestmates. They suggested that the product ruptures the colony cohesion through a modification of the cuticle and interference on the alarm system.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As formigas cortadeiras, principalmente dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, são herbívoros polípagos e consideradas pragas importantes na agrosilvicultura e pastagens no Brasil. O controle desses insetos atualmente é realizado, principalmente, por meio de produtos químicos cujos ingredientes ativos são sulfluramida, fipronil e clorpirifós, incorporados em iscas granuladas, ou, sob termonebulização (DELLA LUCIA e ARAÚJO, 2000). No entanto, na última década investimentos científicos para a descoberta de novas tecnologias e moléculas de origem vegetal têm sido uma constante entre pesquisadores e usuários desse controle.

Na procura de formas alternativas a aquelas tradicionais utilizadas, pesquisadores fazem uso de uma característica que as formigas cortadeiras possuem: a capacidade de selecionar o material vegetal a ser cortado (HUBBELL e WIEMER, 1983; SANTANA, 1988; SANTANA e COUTO, 1990; DELLA LUCIA et al., 1995; VENDRAMIN et al., 1995). Na década de 70, ROCKWOOD (1976) já havia relatado que, embora as formigas cortadeiras tivessem acesso a uma ampla variedade de plantas, não eram todas que sofriam seu ataque. Esta capacidade de seleção é refinada e tem sido alvo de vários estudos (CHERRETT, 1968; LITTLEDYKE e CHERRETT, 1978; CHERRETT, 1986; VASCONCELOS e CHERRETT, 1996).

Hipóteses para tal seleção, segundo HUBBELL e WIEMER (1983) incluem: 1) presença de compostos secundários que são tóxicos para as formigas, para o fungo ou ambos; 2) compostos secundários presentes nas plantas e que possivelmente, reduzem a digestibilidade do material vegetal, como os taninos; 3) o valor e necessidades nutricionais do fungo e das formigas, incluindo proteínas, carboidratos, lipídios e substâncias-traço essenciais, como esteróides; 4) defesas mecânicas de plantas, incluindo sua dureza, densidade de tricomas e presença de látex; e 5) teor de umidade das folhas. A presença de compostos secundários nas plantas, os quais geralmente constituem defesa contra o ataque de diversos herbívoros, tem sido o aspecto mais estudado, possivelmente devido à viabilidade de sua utilização no controle dessas formigas-praga.

RIDLEY et al. (1996) observaram que as formigas cortadeiras tendem a rejeitar plantas que contêm compostos químicos prejudiciais ao fungo e sugeriram que um semioquímico do fungo, difundido por trofalaxia e durante o “grooming” (lambadura), regularia a seleção do material vegetal pelas operárias forrageadoras.

Nesse contexto, em nível de campo, várias plantas são rejeitadas por essas formigas. Em consequência, atualmente os extratos delas têm sido utilizados em estudos de toxicidade principalmente com a saúva-limão, *Atta sexdens rubropilosa* Forel. Como exemplos, pode-se destacar o jatobá (*Hymenaea courbaril*) (HUBBELL et al., 1983), uma espécie de eucalipto (*Eucalyptus maculata*) (ANJOS e SANTANA, 1994), a mamona (*Ricinus communis*) (ACÁCIO-BIGI et al., 1998; BIGI et al., 2004), a batata doce (*Ipomoea batatas*) (HEBLING et al., 2000a), o feijão de porco (*Canavalia ensiformes*) (HEBLING et al., 2000b), o gergelim (*Sesamum indicum*) (BUENO et al., 1995; BUENO et al., 2004a), o cedro (*Cedrela fissilis*) (BUENO et al., 2005), e o barbatimão (*Dimorphandra mollis*) (CINTRA et al., 2005). De acordo com esses autores, os extratos dessas plantas causam efeito tóxico às formigas, ao fungo simbiote cultivado por elas, ou a ambos.

PAGNOCCA et al. (1990), em estudos com *A. sexdens rubropilosa*, relataram que extratos de sementes, frutos e folhas do gergelim causam inibição no crescimento *in vitro* do fungo simbiote desta cortadeira. Mais tarde, BUENO et al. (2004) encontraram que o extrato da semente madura desta mesma planta também causa toxicidade às operárias. Recentemente, MORINI et al. (2005) determinaram que a sesamolina, ou a sesamina, ou até mesmo a combinação destas substâncias é que provocaria tal intoxicação. Já com a mamona, BIGI et al. (2004) constataram que a ricinina seria a principal substância causadora da mortalidade das operárias da saúva-limão mediante o extrato desta planta incorporado à dieta artificial líquida e oferecido a elas.

A batata-doce, outra planta de efeito tóxico às cortadeiras, foi estudada por HEBLING et al. (2000a). Esses autores observaram que folhas desta planta quando oferecidas para colônias de *A. sexdens* em condições de laboratório causaram sua morte após cinco semanas de tratamento. No entanto, os autores não determinaram qual substância provocou a intoxicação. Resultado semelhante foi encontrado em estudos com folhas de feijão-de-porco (HEBLING et al., 2000b) em que se relatou a degeneração completa de colônias de *A. sexdens rubropilosa* após 11 semanas de tratamento. De acordo com ROSENTHAL (1992), a toxicidade desta planta se deve à presença da canavalina que foi encontrada por ele nas sementes. Entretanto, no estudo de HEBLING et al. (2000b) a parte da planta utilizada nos experimentos foi a folha, portanto pode ser que essa substância também esteja presente em outras partes da planta ou até mesmo exista outra substância tóxica às formigas que ainda é desconhecida.

O astilbin, substância isolada do barbatimão, foi utilizado por CINTRA et al. (2005) incorporado em dieta artificial e oferecida diariamente às colônias de *A. sexdens rubropilosa*. Os autores observaram que essa substância causa efeito tóxico às operárias, em todas as concentrações testadas, demonstrando que esse componente presente em altas concentrações em pedúnculos e flores desta planta constitui um inseticida em potencial. Em se tratando do fungo,

BUENO et al. (2005), utilizando extratos de diversas partes da planta do cedro, encontraram que o extrato da raiz causou inibição completa do fungo simbionte de *A. sexdens rubropilosa*.

Já os efeitos nocivos de *Hymenaea courbaril* e *Eucalyptus maculata* sobre colônias de cortadeiras se expressam de forma diferenciada. Em estudos com *Atta cephalotes*, HUBBELL et al. (1983) encontraram que operárias, quando expostas ao epóxido de cariofileno extraído de plantas de *H. courbaril*, exibiram intensa agressividade entre companheiras de ninho. NORTH et al. (2000) utilizando o cariofileno sintético impregnado em iscas atrativas e em fragmentos de papel-filtro em colônias de *A. sexdens rubropilosa*, encontraram que essa substância provoca repelência, alarme, “self-grooming” (auto-limpeza), comportamento agonístico (abertura de mandíbulas e posição de ataque) seguido de luta entre as operárias companheiras de ninho. MARSARO JR. et al. (2004), em estudos com a mesma espécie de formiga, utilizando o β -eudesmol extraído de folhas de *E. maculata* e impregnado em fragmentos de papel-filtro, também encontraram o mesmo comportamento agressivo entre as companheiras de ninho, à semelhança de NORTH et al. (2000).

NORTH et al. (2000) e MARSARO JR et al. (2004) acreditam que essa alteração comportamental, desencadeada pelas operárias quando em contato com o cariofileno e o β -eudesmol, respectivamente, pode ter ocorrido devido a falta e, ou, a interferência no sistema de reconhecimento das suas companheiras de ninho. Em formigas, esse processo é geralmente baseado em pistas químicas presentes na superfície do corpo (WAGNER et al., 2000). Quando um indivíduo não é reconhecido em uma colônia ele é inspecionado e pode ser rapidamente atacado (WHITEHOUSE e JAFFÉ, 1995; DELLA LUCIA et al., 2001; HERNANDEZ et al., 2002). De acordo com WILSON (1971) as pistas do reconhecimento de companheiras de ninho são de natureza química e detectadas quando as antenas de uma formiga entram em contato com a cutícula de outra. Cada colônia apresenta um odor específico que é um conjunto do odor individual e do odor da colônia (CROZIER e DIX, 1979; LENOIR et al., 1999), derivados do meio e de fontes fisiológicas (VANDER MEER e MOREL, 1998).

Nas cortadeiras, segundo o reconhecimento está baseado em feromônios produzidos na cabeça da formiga (JAFFÉ, 1986). Tais substâncias são voláteis de cadeia longa e que são espalhados no corpo dos indivíduos com a atividade de “grooming” e trofalaxia. Substâncias produzidas na glândula mandibular são responsáveis pelo reconhecimento em *A. laevigata* (HERNÁNDEZ et al., 2002). As operárias são ágeis em discriminar não companheiras apenas quando expostas ao extrato dessa glândula, dentre vários produtos oriundos de outras glândulas testados. No entanto, em diversas espécies de formigas, a glândula pós-faringeana (PPG), localizada na cabeça das formigas, é o reservatório dessas substâncias envolvidas no reconhecimento. Estudos demonstraram que o conteúdo dessa glândula coincide com aqueles encontrados na cutícula das formigas (LENOIR et al., 1999). SCHAL et al. (1998) relataram que a superfície do corpo dos insetos é coberta por uma camada de lipídeos, a qual evita a perda de água e protege o inseto contra adversidades do meio. Esta camada de lipídeos é composta principalmente por hidrocarbonetos cuticulares (HCC) que estão envolvidos no processo de reconhecimento das formigas (WAGNER et al., 2000). No que se refere, portanto, ao reconhecimento nas formigas cortadeiras, permanecem dúvidas sobre qual das glândulas, a mandibular ou a pós-faringeana, estão envolvidas no reconhecimento individual. Este comportamento nas formigas é um mecanismo muito eficiente para a manutenção da coesão das colônias e até mesmo a sua defesa (HÖLLDOBLER e WILSON, 1991), constituindo-se um dos entraves para o controle das formigas-pragas. No entanto, existe a possibilidade de que alguma substância, como é o caso do β -eudesmol, interferir no mecanismo de reconhecimento das formigas e, assim, constituir-se em ferramenta com potencial para provocar a ruptura da coesão das colônias e sua posterior extinção.

Os objetivos desta pesquisa foram:

i) Avaliar o efeito de diferentes concentrações do β -eudesmol sintético, em colônias de laboratório de *A. sexdens rubropilosa*;

ii) Avaliar o efeito do β -eudesmol adquirido comercialmente, sobre operárias de diversas espécies de formigas pragas em laboratório.

iii) Determinar o mecanismo envolvido no comportamento de agressão desencadeado pelo β -eudesmol em *A. sexdens rubropilosa*.

As hipóteses a serem testadas são:

I. Diferentes concentrações do produto irão provocar efeitos comportamentais de intensidade diferente nas operárias;

II. O β -eudesmol desencadeia agressividade nas várias espécies de formigas cortadeiras e lava-pés;

III. O β -eudesmol altera o perfil químico cuticular das operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

A introdução desta tese está de acordo com as normas da ABNT. O primeiro artigo está de acordo com as normas do periódico *Entomologia Experimentalis et Applicata*, onde foi publicado em 2005, o segundo artigo segue as normas do periódico *Sociobiology*, onde foi aceito para publicação em 200, e o terceiro artigo segue as normas do periódico *Journal of Insect Behavior*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACÁCIO-BIGI, M. F. M.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A.; FERNANDES, B. P.; VIEIRA, C. Toxicidade de extratos foliares de *Ricinus communis* L. para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 41, n. 2-4, p. 239-243, 1998.
- ANJOS, N.; SANTANA, D. L. Q. Alterações deletérias no comportamento de *Atta laevigata* (F. Smith) e *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae), causadas por folhas de *Eucalyptus* spp. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, n. 1, p. 25-30, 1994.
- BIGI, M. F. M. A.; TORKOMIAN, V. L. V.; GROOTE, S. T. C. S.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, B. P.; VIEIRA, C.; SILVA, M. F. G. F. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. **Pest Management Science**, v. 60, n. 1, p. 933-938, 2004.
- BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; BETELLA, G.; MORONI, M. S. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; LEITE, A. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Toxicity of sesame extracts to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 44, n. 3, p. 599-606, 2004.
- BUENO, F. C.; GODOY, M. P.; LEITE, A. C.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of *Cedrela fissilis* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus. **Sociobiology**, v. 45, n. 2, p. 389-399, 2005.
- CHERRETT, J. M. Some factors involved in the selection of vegetable substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in tropical rain forest. **Journal of Animal Ecology**, v. 41, n. 1, p. 647-660, 1986.
- CHERRETT, J. M. The foraging behaviour of *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Animal Ecology**, v. 37, n. 1, p. 387-403, 1968.
- CINTRA, P.; BUENO, F. C.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B. Astilbin toxicity to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 45, n. 2, p. 347-353, 2005.
- CROZIER, R. H.; DIX, M. W. Analysis of two generic models for the innate components of colony odour in social Hymenoptera. **Behavior Ecology and Sociobiology**, v. 4, n. 1, p. 217-224, 1979.
- DELLA LUCIA, T. M. C.; ARAUJO, M. S. Formigas cortadeiras: Atualidades no combate. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado – doenças, pragas e plantas daninhas**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2000. p. 245-273.
- DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F.; MOREIRA, D. D. O. Feromônios de formigas pragas. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. (Eds.). **Feromônios de insetos**. Ribeirão Preto, Brasil: Holos, 2001. p. 73-82.

- DELLA LUCIA, T. M. C., OLIVEIRA, M. A., ARAÚJO, M. S., VILELA, E. F. Avaliação da não-preferência da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel ao corte de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 19, n. 1, p. 92-99, 1995.
- HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; MAROTI, P. S.; PAGNOCCA, F. C.; DA SILVA, O. A. Effects of leaves of *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) on nest development and on respiratory metabolism of leaf-cutting ants *Atta sexdens* L. (Hym., Formicidae). **Journal Applied Entomology**, v. 124, n. 1, p. 249-252, 2000a.
- HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A.; MAROTI, P. S. Toxic effects of *Canavalia ensiformes* L. (Leguminosae) on laboratory colonies of *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae). **Journal Applied Entomology**, v. 124, n. 1, p. 33-35, 2000b.
- HERNÁNDEZ, J. V.; LÓPEZ, H.; JAFFÉ, K. Nestmate recognition signals of the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, n. 3, p. 287-295, 2002.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. 732p.
- HUBBELL, S. P.; WIEMER, D. F. Host plant selection by an Attini ant. In: JAISSON, P. (Ed.). **Social Insects in the tropics**. Paris: University of Paris, 1983. v. 2, p. 133-154.
- HUBBELL, S. P.; WIEMER, D. F.; ADEJARE, A. An antifungal terpenoid defends a Neotropical tree (Hymenaeae) against attack by fungus-growing ants (*Atta*). **Oecologia**, v. 60, n. 1, p. 321-327, 1983.
- JAFFÉ, K. Nestmate recognition and territorial marking in *Solenopsis geminate* and some Attini, In: Lofgren, C. S., Vander Meer, R. K. (Eds.). **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder: Westview, 1986. p. 211-222.
- LENOIR, A.; FRESNEAU, D.; ERRARD, C.; HEFETZ, A. Individuality and colonial identity in ants: the emergence of the social representation concept. In: DETRAIN, C.; DENEUBORG, J. L.; PASTEELS, J. M. (Eds.). **Information Processing in Social Insects**. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel, 1999. p. 219-237.
- LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. M. Defense mechanisms in young and old leaves against cutting by leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 68, n. 1, p. 263-271, 1978.
- MARSARO JR., A. L.; SOUZA, R. C.; DELLA LUCIA, T. M. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C. Behavioral changes in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 9, p. 1771-1780, 2004.
- MORINI, M. S. C.; BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; LEITE, A. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of sesame seed to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 45, n. 1, p. 195-204, 2005.
- NORTH, R. D.; HOUSE, P. E.; JACKSON, C. W. Agonistic behavior of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* elicited by caryophyllene. **Journal of Insect Behavior**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2000.

- PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A.; HEBLING-BERALDO, M. J.; BUENO, O. C. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Bulletin of Entomological Research**, v. 80, n. 1, p. 349-352, 1990.
- RIDLEY, P.; HOWSE, P. E.; JACKSON, C. W. Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their 'symbiotic' fungus. **Experientia**, v. 52, n. 6, p. 631-635, 1996.
- ROCKWOOD, L. L. Plant selection and foraging patterns in two species of leaf-cutting ants (*Atta*). **Ecology**, v. 57, n. 1, p. 48-61, 1976.
- ROSENTHAL, G. A. Purification and characterization of the higher plant enzyme L-canalina reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 5, p. 1780-1784.
- SANTANA, D. A. Q. **Resistência de *Eucalyptus* spp. às formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 e *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae)**. Viçosa, MG: UFV, 1988. 95p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- SANTANA, D. A. Q.; COUTO, L. Resistência intra-específica de eucaliptos a formigas-cortadeiras. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 20, n. 1, p. 13-21, 1990.
- SCHAL, C.; SEVALA, V.L.; YOUNG, H.; BACHMANN, J. A. S. Sites of synthesis and transport of hydrocarbons: Cuticle and ovary as target tissues. **American Zoologist**, v. 38, n. 1, p. 382-393, 1998.
- VANDER MEER, R. K.; MOREL, L. Nestmate recognition in ants. In: VANDER MEER, R. K. (Ed.). **Pheromone communication in social insects**. Boulder: Westview, 1998. p. 79-103.
- VASCONCELOS, H. L.; CHERRETT, J. M. The effect of wilting on the selection of leaves by the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 78, n. 1, p. 215-220, 1996.
- VENDRAMIN, J. D.; SILVEIRA NETO, S.; CERIGNONI, J. A. Não-preferência de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) por espécies de *Eucalyptus*. **Ecossistema**, v. 20, n. 1, p. 87-92, 1995.
- WAGNER, D.; TISSOT, M.; CUEVAS, W.; GORDON, D. M. Harvester ants utilize cuticular hydrocarbons in nestmate recognition. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 10, p. 2245-2257, 2000.
- WHITEHOUSE, M. E. A.; JAFFÉ, K. Nestmate recognition in the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. **Insectes Sociaux**, v. 42, n. 1, p. 157-166, 1995.
- WILSON, E. O. **The insect societies**. Cambridge: Harvard University, 1971. 548p.

CAPÍTULO 1

β -EUDESMOL-INDUCED AGGRESSION IN THE LEAF-CUTTING ANT *Atta sexdens rubropilosa*

ABSTRACT

Leaf-cutting ants are highly polyphagous insects but some plants escape their attack due to the presence of secondary metabolites that are toxic to the ant-fungus symbiosis. Previous studies demonstrated that the terpenoid β -eudesmol extracted from *Eucalyptus* is responsible for a deleterious behavior in colonies of leaf-cutting ants species. The objective of this study was to evaluate the effect of β -eudesmol on workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. This chemical caused behavioral modification in the colonies leading to workers mutilation and death. It is suggested that β -eudesmol interferes on colony nestmate recognition. As a consequence, colony cohesion may be disrupted and it could be used as an additional control tactic against this important pest ant.

Keywords: *Eucalyptus maculata*, ant behavioral changes, Hymenoptera, Formicidae, recognition system, chemical communication.

INTRODUCTION

Leaf-cutting ants, as social insects, use recognition systems to distinguish nestmates (Lenoir et al., 1999). This complex recognition behavior is based on individual ant and colony odor, and is indispensable for colony maintenance (Crozier & Dix, 1979). These odors or cues are of a chemical nature, and are characteristic of each colony.

Jutsum et al. (1997) demonstrated the importance of environmental cues such as leaf substrate in the recognition process. According to Jaffé (1983), the head is the body part where substances responsible for nestmate recognition are accumulated; the alarm pheromone, also produced in the head, could be involved in the process. Nestmate recognition in *Atta laevigata* is based on odors from the secretion of mandibular glands and these odors are dispersed throughout the ant cuticle (Hernández et al., 2002). When recognition does not occur, aggressive behavior ensues (Whitehouse & Jaffé, 1995; Della Lucia et al., 2001; Hernández et al., 2002) and several attack strategies result.

Interference with recognition is a form of disrupting the society and could have extreme effects on colonies, including death (Marsaro Jr. et al., 2004). This might be very effective in the control of leaf-cutting ants, which are considered severe pests throughout Central and South America (Della Lucia et al., 2001).

The leaf-cutting ants *Atta laevigata* F. Smith and *A. sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) exhibit a peculiar behavioral modification among nestmates when in contact with leaves of *Eucalyptus maculata* Hook (Myrtaceae) (Anjos & Santana, 1994). When supplied with *E. maculata* leaves, the workers of *A. laevigata* and *A. sexdens rubropilosa* bit and mutilated body parts of their own nestmates (Anjos & Santana, 1994). Marsaro Jr. et al. (2004) recently reported that β -eudesmol and elemol were the substances present in *E. maculata* that

interfered with nestmate recognition. When workers were exposed to these sesquiterpenes they began exhibiting aggressive behavior towards each other.

This study aimed at testing various concentrations of synthetic β -eudesmol on colonies of *A. sexdens rubropilosa* to determine their effect on workers behavior.

MATERIALS AND METHODS

2.1. Colony collection and maintenance

A total of six colonies were used in the bioassays. Three colonies had 25L of fungus garden (large size colonies) and were seven years old. The other three had 1.5L of fungus (small size colonies) and were two years old. The colonies were maintained at 24 ± 5 °C, 75 ± 5 % r.h. and L12:D12 photoperiod in the laboratory according to Della Lucia et al. (1993). They were supplied daily with water and leaves of several plant species such as *Ligustrum japonicum*, *Tecoma stans*, *Acalipha wilkesiana*, *Rosa* sp. and cereals.

2.2. Bioassays

The synthetic β -eudesmol was obtained from Sigma-Aldrich Química Brasil (São Paulo, Brazil). All leaves on the foraging arena of the colonies were removed six hours prior to the tests in order to avoid interference on the results. Filter paper (Whatman n^o. 1) fragments of 6 cm² in the shapes of rectangles, triangles, and squares (Marsaro et al., 2004) were used for the assays. As *A. sexdens rubropilosa* does not show shape preferences among the fragments, the different shapes were used for the individual chemical concentrations to facilitate their recognition during the bioassays (Santana et al., 1990). Triangular fragments were impregnated with 100 μ l of β -eudesmol diluted in the solvent hexane (the concentration treatments); square fragments were impregnated with 100 μ l of hexane alone (control), and rectangular fragments were neither impregnated with the solvent nor with β -eudesmol diluted in the solvent (serving as an additional control against a possible effect of the solvent). β -eudesmol was tested in six concentrations previously diluted in hexane: 0, 10, 100, 500, 750, 1000 μ g/mL⁻¹. The amount of solution necessary to achieve complete impregnation of any filter-paper fragment was always 100 μ L, regardless of the treatment (β -eudesmol + hexane in each one of the concentrations) or the control (hexane). The chemicals for the control and chemical treatments were pipetted onto their

respective filter paper fragments. Five minutes after solvent evaporation, all fragments were simultaneously offered to the workers at the foraging arenas of the colonies. Each bioassay lasted 30 minutes and ant worker behavior was recorded. An aggression group was defined as two or more nestmates fighting resulting in mutilation or dead. At the end of each bioassay, the aggression groups were removed and each placed individually in 10 mL vials. The numbers of aggression groups formed, of ants fighting, and of dead or mutilated ants in each group were counted at the end of each bioassay.

All bioassays were conducted in three replicates. The β -eudesmol was tested once on each one of three large colonies and on each one of three small colonies. Only one series of concentrations was applied to each colony to avoid colony conditioning. The bioassays were performed from the lowest to the highest product concentration, with one-week interval between each test. The positioning of the filter paper fragments was altered for the various β -eudesmol concentrations to avoid ant conditioning.

The data were subjected to analysis of covariance with ant colony size as the independent variable and β -eudesmol concentration as covariable (PROC GLM), and subsequently subjected to regression analyses (PROC REG; SAS Institute 1989). As the β -eudesmol concentrations of 0, 10 and 100 μ g/mL did not elicit response, only the concentration of 100 μ g/mL was included in these analyses together with the higher concentrations of β -eudesmol tested (i. e., 500, 750 and 1000 μ g/mL). Only the number of mutilated ants had to be transformed to $\log_{10}(x+1)$ to stabilize variance and to satisfy normality assumptions (PROC UNIVARIATE; SAS Institute 1989).

RESULTS

When colony workers contacted filter paper fragments impregnated with β -eudesmol at $500 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ or higher, aggression groups formed (Figures 1-4). This did not occur when the colonies were exposed to the control treatment, even when the fragments were carried into the fungus garden. The behavioral sequence exhibited by workers in contact with β -eudesmol was individual excitement, alarm (open mandibles), self-grooming (legs and antennae) and when in contact with a nestmate, antennal inspection followed by an attack. These attacks consisted of leg, antennae, and abdomen biting. Biting of other body parts occurred, but at a less frequent rate. Immediately after the formation of the first aggression group, new groups formed and the number of ants in close proximity to the β -eudesmol impregnated filter paper increased.

The number of aggression groups formed varied significantly with colony size, β -eudesmol concentration, and their interaction (Table 1). Small colonies did not respond to increasing concentrations of β -eudesmol (Figure 1). However, there was an increase in number of aggression groups formed in the large colonies with increasing β -eudesmol concentrations (Figure 1). Nevertheless, the interaction between colony size and β -eudesmol concentration did not affect significantly the number of ants per aggression group (Table 1). The number of ants per aggression group was therefore pooled together to test the isolated effect of colony size, which was not significant, and β -eudesmol concentrations, which was significant (Table 1). There was an increase in the number of ants per group with increased concentrations of β -eudesmol (Figure 2). These findings indicate that higher concentrations of β -eudesmol increase colony disruption.

The number of mutilated ants showed the same trend observed for the number of ants per aggression group (Table 1). The interaction between colony size and β -eudesmol concentration was not significant and the pooled data indicated significant differences only for β -eudesmol

concentration, not for colony size (Table 1). The fitted curve indicated an increase in mutilated ants with increased concentrations of β -eudesmol (Figure 3). In contrast, the number of dead ants followed a trend similar to the number of aggression groups formed where the interaction between colony size and β -eudesmol concentration was significant (Table 1). However, the small ant colonies did not respond to the chemical, unlike the larger colonies that showed increased response with increased β -eudesmol concentrations (Figure 4).

DISCUSSION

The behavioral sequence observed for synthetic β -eudesmol was also verified for the natural product extracted from *E. maculata* plants by Marsaro et al. (2004). Modification of the behavior of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* upon exposure to concentrations of caryophellene epoxide extracted from *Hymenaea courbaril* was also observed by Hubbell et al. (1983). According to these authors, ants jumped or reared back into the arena and began intense grooming.

Our results demonstrate that ant workers in contact with β -eudesmol develop aggressive behavior. In addition to a simple aggressive behavior, the response to this compound could be that it interferes on nestmate recognition in such a way to elicit aggression. We believe this second possibility is the most correct based on the fact that aggression started when one worker contacted the product and other workers contacted that worker. Thereafter, a chain of aggressive behavior followed.

We verified that only ants at the foraging arena engaged in fights. Those that worked in the fungus garden did not come in contact with the impregnated filter paper, and do not exhibit behavioral changes. Our results indicate that synthetic β -eudesmol induces aggressiveness in workers of *A. sexdens rubropilosa*. The workers of this ant species avoid cutting *E. maculata* leaves in the field (Anjos & Santana, 1994) probably due to the presence of sesquiterpenes, among which β -eudesmol is predominant.

The aggressive behavior between nestmates in contact with β -eudesmol seemed to result from the lack of or interference with the recognition ability of these ants. Ant nestmate recognition has been widely studied and reviewed (Carlin & Hölldobler, 1987; Lahav et al., 1999; Lenoir et al., 1999; Howard & Bloomquist, 2004) and is very important for colony success. According to Crozier & Dix (1979), nestmate recognition occurs by means of odors originated from a mixture of genetic factors (endogenous) and environmental factors

(exogenous). The latter can vary according to habitat, food, seasons, and climactic changes. The relative importance of each factor varies with species, although little is known about it in leaf-cutting ants (Jutsum et al., 1979; Viana et al., 2001; Hernández et al., 2002). The compound β -eudesmol might interfere with nestmate recognition by changing hydrocarbon profiles or by blocking olfaction. This certainly requires further investigation.

The number of dead individuals varied with colony size but the number of mutilated live ants was similar in small and large colonies. These results are probably due to a greater capacity of large colonies to fight, thus resulting in a higher number of dead individuals. In smaller colonies, fighting capacity was less developed so combat was weaker.

In conclusion, β -eudesmol brings about a behavioral alteration in ant workers of *A. sexdens rubropilosa* when they are exposed to increasing concentrations of this compound particularly for large ant colonies and at concentrations equal to or higher than $500 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. In the presence of such β -eudesmol concentrations, nestmates seem not to recognize each other. Because of the disruption caused on ant colonies, β -eudesmol warrants further study as a potential control tool against leaf-cutting ants.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for scholarships and support. The authors express their gratitude to Dr. Rosa Muchovej, University of Florida, Southwest Florida Research and Education Center and Stephen Muchovej, Columbia University, for valuable comments and revision of this manuscript.

REFERENCES

- Anjos N & Santana DLQ (1994) Alterações deletérias no comportamento de *Atta laevigata* (F. Smith) e *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae), causadas por folhas de *Eucalyptus* spp. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 23: 25-30.
- Carlin N & Hölldobler B (1987) The kin recognition system of carpenter ants (*Camponotus* sp.) II. Large colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 20: 209-217.
- Crozier RH & Dix MW (1979) Analysis of two generic models for the innate components of colony odour in social Hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 4: 217-224.
- Della Lucia TMC, Vilela EF, Anjos N & Moreira DDO (1993) Criação de formigas cortadeiras em laboratório. In: Della Lucia T M C (ed), *Formigas Cortadeiras*. Folha de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, pp. 151-162.
- Della Lucia TMC, Vilela EF & Moreira DDO (2001) Feromônios de formigas pragas. In: Vilela EF, Della Lucia TMC (eds), *Feromônios de Insetos*. Holos, Ribeirão Preto, S.P., Brasil, pp. 73-82.
- Hernández JV, Lopez H & Jaffé K (2002) Nestmate recognition signals of the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Journal of Insect Physiology* 48: 287-295.
- Howard RW & Blomquist GJ (2004) Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Reviews of Entomology* 50: 371-393.
- Hubbell SP, Wiemer DF & Adejare A (1983) An antifungal terpenoid defends a neotropical tree (Hymeneae) against attack by fungus-growing ants (*Atta*). *Oecologia* 60: 321-327.
- Jaffé K (1983) Chemical communication among workers of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. In: Jaisson P (ed), *Social Insects in the Tropics*, Vol. 2. University of Paris Press, Paris, pp. 165-180.

- Jutson AR, Saunders TS & Cherrett JM (1979) Intraspecific aggression in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Animal Behavior* 27: 839-844.
- Lahav S, Soroker V & Hefetz A (1999) Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discrimination. *Naturwissenschaften* 8: 246-249.
- Lenoir A, Fresneau D, Errard C & Hefetz A (1999) Individuality and colonial identity in ants: the emergence of the social representation concept. In: Detrain C, Deneuborg J L & Asteels J M (eds), *Information Processing in Social Insects*. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, pp. 219-237.
- Marsaro AL Jr, Souza RC, Della Lucia TMC, Fernandes JB, Silva MFGF & Vieira PC (2004) Behavioral changes in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. *Journal of Chemical Ecology* 30: 1771-1780.
- Santana DLQ, Della Lucia TMC & Zanuncio JC (1990) Influência do formato de amostras de folhas de *Eucalyptus* spp. na atratividade a formigas cortadeiras *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* 19: 72-80.
- SAS Institute (1989) *SAS/STAT User's Guide*, version 6. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Viana AMM, Frezard A, Malosse C, Della Lucia TMC, Errard C & Lenoir A (2001) Colonial recognition of fungus in fungus growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology* 11: 29-36.
- Whitehouse MEA & Jaffé K (1995) Nestmate recognition in the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Insectes Sociaux* 42: 157-166.

Table 1. Analysis of covariance showing the interactions among colony size of *Atta sexdens rubropilosa* and concentrations of β -eudesmol. Asterisks indicate significant differences at $P < 0.05$.

Sources of variation	Degrees of freedom	Number of aggression groups formed		Number of ants per aggression group		Number of mutilated ants		Number of dead ants	
		F	P	F	P	F	P	F	P
		Model	7	10.54	<0.0001*	9.95	<0.0001*	9.16	<0.0001*
Error	16	-	-	-	-	-	-	-	-
Colony	1	10.36	0.0054*	4.55	0.06	1.35	0.26	42.86	<0.0001*
Concentration	3	12.34	0.0002*	19.53	<0.0001*	17.87	<0.0001*	55.03	<0.0001*
Col. X Conc.	3	8.80	0.0011*	2.16	0.13	3.06	0.0584	39.90	<0.0001*

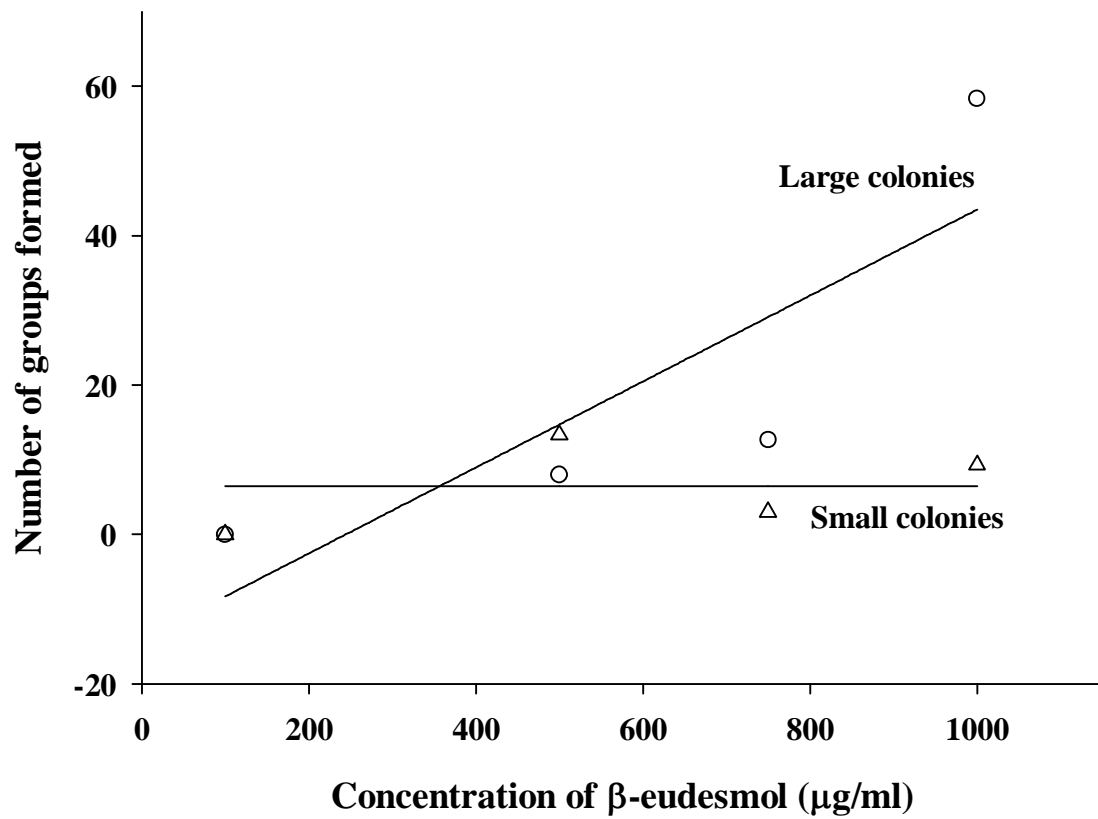


Figure 1. Number of aggression groups formed in large (circle) and small (triangle) colonies of *Atta sexdens rubropilosa* when workers were exposed to varying concentrations of β -eudesmol. Each symbol represents the mean of three replicates. (Small colonies: $y = 6.42$; $P > 0.05$) (Large colonies: $y = - 4.05 + 0.06x$; $df_{\text{error}} = 10$; $F = 14.13$; $P = 0.004$; $R^2 = 0.59$).

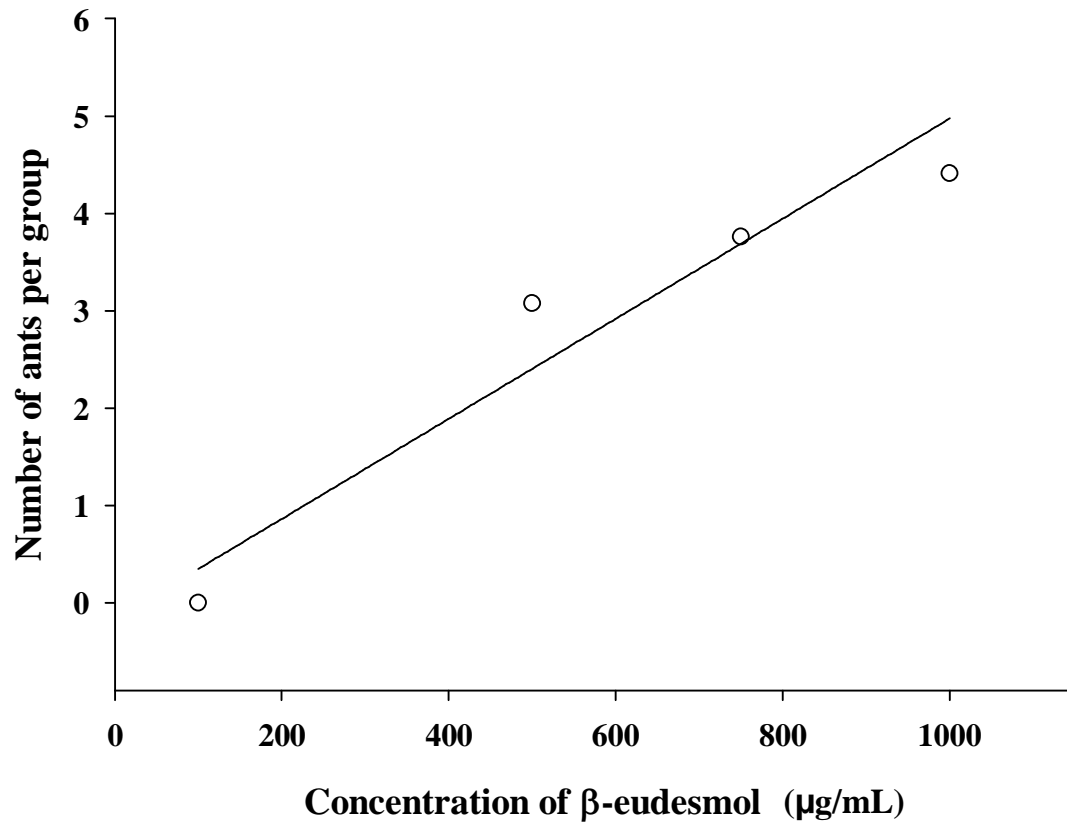


Figure 2. Number of ants per aggression group formed when *Atta sexdens rubropilosa* nestmates were exposed to varying concentrations of β -eudesmol. Each symbol represents the mean of six replicates. ($y = -0.17 + 0.0051x$; $df_{\text{error}} = 22$; $F = 14.74$; $P = 0.004$; $R^2 = 0.40$).

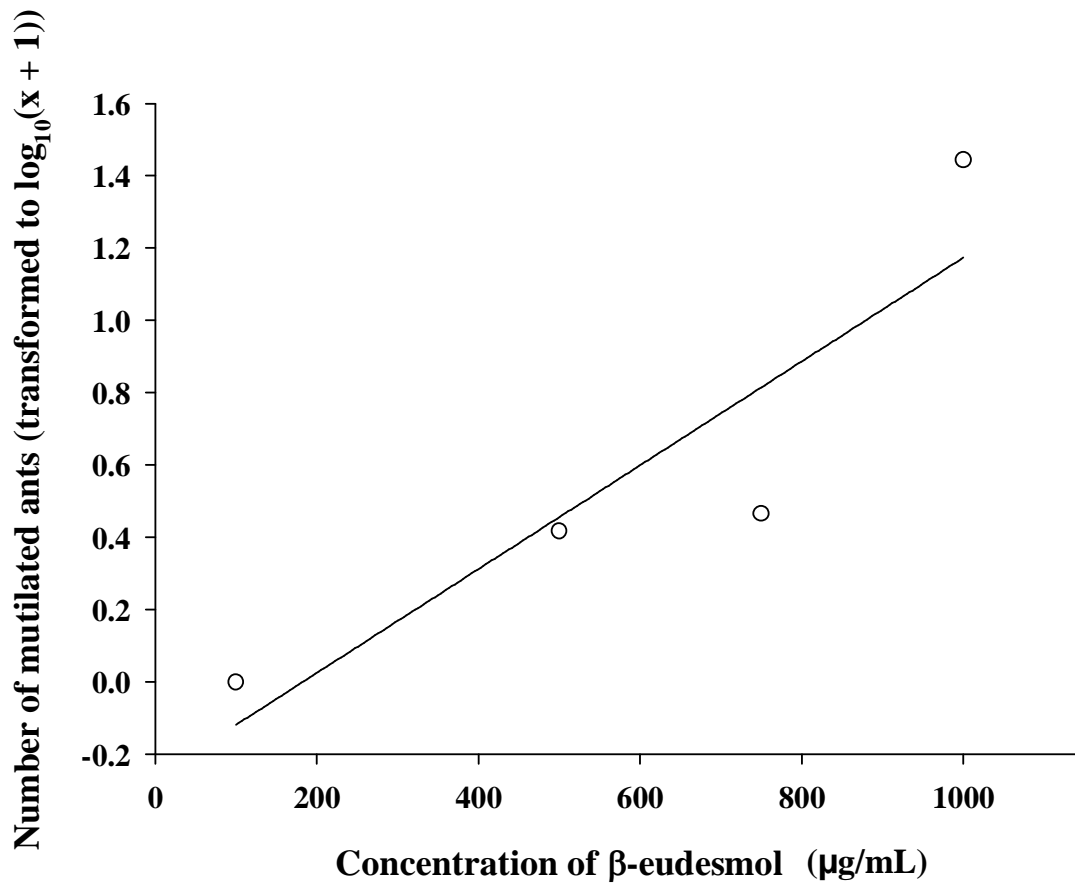


Figure 3. Number of mutilated ants (transformed to $\text{Log}_{10}(x + 1)$) when *Atta sexdens rubropilosa* nestmates were exposed to varying concentrations of β -eudesmol. Each symbol represents the mean of six replicates. ($y = -0.26 + 0.0014x$; $df_{\text{error}} = 22$; $F = 26.20$; $P < 0.0001$; $R^2 = 0.54$).

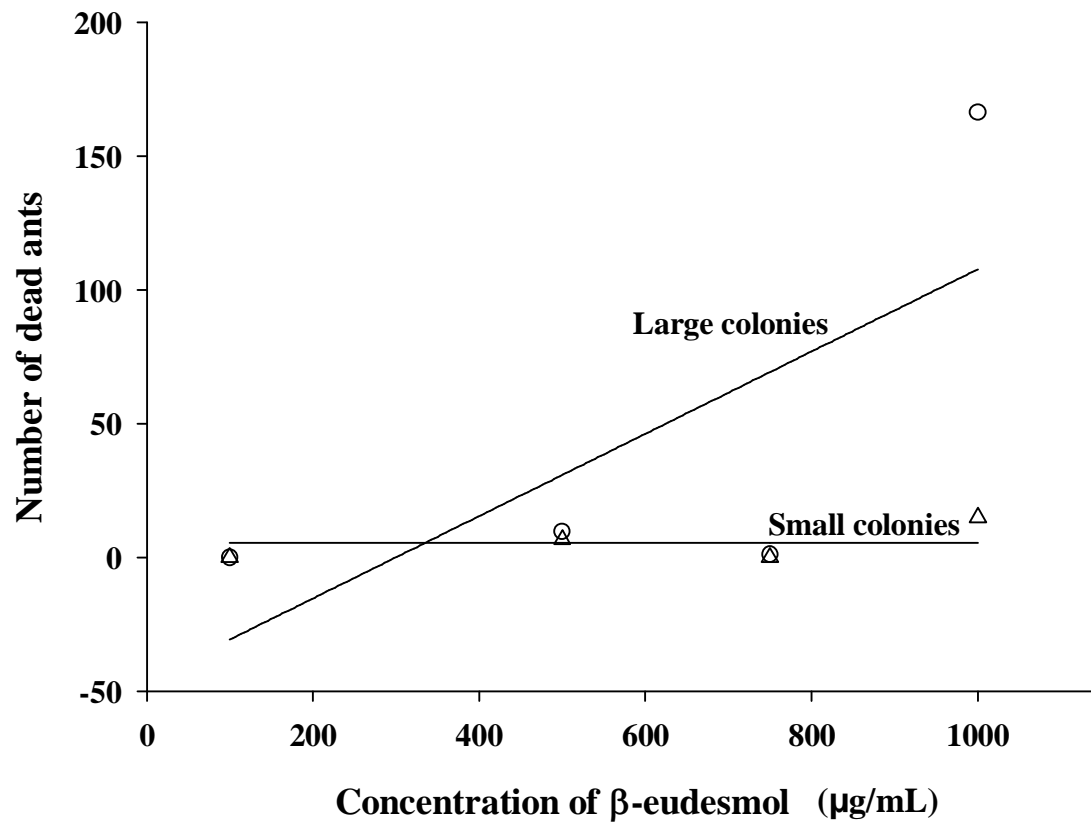


Figure 4. Number of dead ants of *Atta sexdens rubropilosa* nestmate workers from large (circle) and small (triangle) colonies exposed to varying of concentrations of β -eudesmol. Each symbol represents the mean of three replicates. (Small colonies: $y = 4.42$; $P > 0.05$) (Large colonies: $y = -46.06 + 0.15x$; $df_{\text{error}} = 10$; $F = 10.08$; $P = 0.009$; $R^2 = 0.50$).

CAPÍTULO 2

Aggressive response of pest ant species (Hymenoptera: Formicidae) to β -eudesmol

ABSTRACT

Previous studies with β -eudesmol, a compound originally extracted from *Eucalyptus maculata* leaves that promoted behavioral alteration in *Atta sexdens rubropilosa* workers, led to the present investigation. This work aimed to evaluate the effect of synthetic β -eudesmol on colonies of several species or subspecies of leaf-cutting ants and on the fire ant *Solenopsis invicta*, all of which are considered pests in the Americas. β -Eudesmol induced aggressive behavior only in workers of the *Atta* species; the effect was more pronounced in *A. sexdens rubropilosa*, one of the most severe leaf-cutters in Brazil. These results suggest the selectivity of β -eudesmol to that subspecies and that further investigation should be carried out to evaluate the potential of this compound as an additional tool in ant management.

Keywords: *Eucalyptus maculata*, *Solenopsis invicta*, leaf-cutting ants, aggressive behavior, ant behavioral changes.

INTRODUCTION

The pest status of leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) in Latin America, especially in Brazil, is known worldwide. On the other hand, although fire ants are considered pest species in that country, they are much more economically important in the United States where they are exotic species, attacking and causing allergy to man and domestic animals (Williams & deShazo 2004), damaging electrical equipment (Vinson & Mackay 1990) etc. Control measures against both groups of pest ants are following the trend of environmental and biodiversity preservation as any other pest management program nowadays. Therefore, in the case of leaf-cutting ants in Brazil, a great deal of effort has been dedicated to the study of toxic plants that could bring about new control molecules with lower environmental impact (Bigi *et al.* 2004; Hebling *et al.* 2000a; Hebling *et al.* 2000b).

Other studies have considered behavioral alterations in workers of leaf-cutting ants when exposed to substances extracted from plants such as caryophyllene epoxide (Hubbel *et al.* 1983), caryophyllene (North *et al.* 2000) and β -eudesmol (Marsaro *et al.* 2004; Marinho *et al.* 2005). The ultimate goal of this research area has been colony disruption and possibly colony death.

The aim of this study was to evaluate the effect of synthetic β -eudesmol on the behavior of leaf-cutting ants *Atta* spp. and *Acromyrmex* spp. and on the fire ant *Solenopsis invicta*.

MATERIALS AND METHODS

The following species or subspecies were used in these experiments: *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta bisphaerica*, *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *Acromyrmex subterraneus molestans* and *Solenopsis invicta* in a total of 42 colonies. Seven colonies of *S. invicta* were collected at the campus of Federal University of Viçosa and maintained under laboratory conditions at temperature, relative humidity and photoperiod of $24\pm 5^{\circ}$, $75\pm 5\%$ and 12:12 (L:D), respectively. Seven colonies of each leaf-cutting ant species or subspecies ranging from 5 to 6L of fungus garden volume were used in addition to those of *S. invicta*.

The colonies of leaf-cutting ants and fire ants used in this experiment were collected in the counties of Viçosa and Teixeiras, State of Minas Gerais, Brazil ($20^{\circ} 45' S$ $42^{\circ} 51' W$). Leaf-cutting ant colonies were maintained under the same laboratory conditions as described by Della Lucia *et al.* (1993). They were offered a daily supply of water, cereals and leaves of several plant species including *Ligustrum japonicum*, *Tecoma stans*, *Acalypha wilkesiana* and *Rosa* sp., for all of the species except the grass-cutting ant (*A. bisphaerica*), which received leaves of *Paspalum notatum*, and the red imported fire ant (*S. invicta*), which received larvae of insects and sucrose in solution each day as well as water (Banks 1981).

The synthetic β -eudesmol was obtained from Sigma Aldrich Química Brazil (São Paulo, Brazil). All leaves (or food in the case of the fire ant) on the foraging arena of the colonies were removed 6hs prior to the tests in order to avoid interference with the results. Filter paper (Whatman n^o. 1) fragments of 6 cm² in shapes of rectangles, triangles and squares (Marsaro *et al.* 2004; Marinho *et al.* 2005) were used for the assays. As the ants do not show shape preferences among fragments (Santana *et al.* 1990), the different shapes were used for the chemical treatments (with β -eudesmol and two controls) to facilitate their recognition during the bioassays. Triangular fragments were impregnated with 100 μ L of 1.5 mg.mL⁻¹ of β -eudesmol

diluted in the solvent hexane (the treatment), square fragments were impregnated with 100 μ L of hexane alone (control), and rectangular fragments were neither impregnated with solvent nor with β -eudesmol, serving as an additional control against possible effect of the solvent.

β -eudesmol previously diluted in hexane was tested at the concentration of 1.5 mg.mL⁻¹ based on the results of a previous work (Marinho *et al.* 2005) and preliminary tests carried out with the different ant species. The positions of the filter paper fragments (treated and controls) were switched after each bioassay in order to avoid pre-conditioning.

The chemical solutions were pipetted onto their respective filter paper fragments. Five minutes after solvent evaporation all fragments were simultaneously offered to the workers at the foraging arenas of the colonies. Each bioassay lasted 30 minutes and ant worker behavior was recorded. An aggression group was defined when two or more nestmates were found fighting, or by finding ants mutilated, or dead. At the end of the bioassay, these groups were removed and individually placed in 10mL vials for posterior counting. Times of aggression initiation and duration were recorded.

β -eudesmol was further tested by topical application to media worker ants when aggression had occurred in the previous bioassays with colonies. Results of preliminary tests indicated that 1 μ L of the solvent on media workers should be used in the subsequent assays. Twenty workers were removed from each of seven colonies to be utilized in each of 10 replicates per each of three concentrations (0.5, 1.0 or 1.5 mg.mL⁻¹). This was carried out for all the leaf-cutters that responded to β -eudesmol on the previous bioassay. The different concentrations of β -eudesmol (and control with only the solvent hexane) were topically applied on the pronotum of a medium worker using an automatic microapplicator (Burkard, Rickmansworth, UK). All these workers had been previously marked with paint (Testors®) in the gaster to facilitate visualization. After the application, the ant was placed in a 100mL plastic cup for solvent evaporation. Immediately after this procedure, another nestmate ant was placed in the same cup. During a three-minute period this dyad was observed and its behavior, recorded.

RESULTS

The colonies of the six species (subspecies) of ants exhibited distinct behavior when exposed to β -eudesmol. This product elicited aggressiveness among nestmates only in the three *Atta* spp. Analysis of variance was therefore carried out only for them and showed significant differences in the number of aggression groups formed ($F_{2,18} = 4.36$, $p = 0.029$). Subsequent multiple range comparisons (Fisher's least significant difference at $p = 0.05$) indicated the strongest reaction in *A. sexdens rubropilosa* workers as evidenced by the high number of groups of fighting ants formed (Fig. 1).

β -eudesmol did not elicit any behavioral modification among nestmates of *Acromyrmex* spp. and *S. invicta*. Behavioral modification in *Atta* nestmates when exposed to β -eudesmol can be described as follows. When one ant touches the filter paper with the product, it shows an alarm reaction: open mandibles and elevated antennae. Another ant that contacts the first quickly inspects her and attacks one of her body appendages (legs, antennae) or frequently the petiole. Biting is long lasting, so that it results in worker mutilation. Immediately after the formation of the first aggression group, new groups are formed and the number of ants in close proximity to the β -eudesmol-impregnated filter paper increases. It was also observed that some ants bite the filter paper and remain attached to it until death due to the attack by other nestmates.

The mean time spent for aggression group formation (transformed to $\log_{10}(x)$ to stabilize the variance) and the mean duration of aggressiveness were calculated only for those species that showed response and again there were significant differences among them based on analysis of variance ($F_{2,9} = 5.97$, $p = 0.022$ and $F_{2,9} = 8.24$, $p = 0.009$ respectively) and subsequent multiple range tests (Fisher's least significant difference at $p = 0.05$). *A. laevigata* was the quickest species in showing aggressive behavior (Fig. 2), but the greatest length of aggressive behavior was exhibited by *A. sexdens rubropilosa* followed by *A. laevigata* (Fig. 3). The grass-cutter

species *A. bispharica* showed significantly shorter period of nestmate aggression than both of the other *Atta* species (Fig. 2) but it does not sustain the aggressive behavior for long (Fig. 3).

Topically applied β -eudesmol did not elicit any aggressive reaction when the treated ant was placed in contact with nestmates of the *Atta* species studied.

DISCUSSION

The agonistic behavior induced by β -eudesmol in leaf-cutting ants seems to be restricted to the genus *Atta*, particularly *A. sexdens rubropilosa*. Thus, any attempt to use this product as an additional tool for the management of these other ant pest genera can be discarded. This result agrees with those obtained by Marinho *et al.* (2005) when small colonies (approximately 1.5L of fungus garden volume) and large colonies (25L of fungus garden) of *A. sexdens rubropilosa* were tested. In large colonies increasing concentrations of the product increased the number of aggression groups, this did not occur in small colonies.

The aggressive behavior in *Atta* colonies elicited by β -eudesmol still remains to be elucidated. However, it is known that each colony has its own characteristic odor (Lenoir *et al.* 1999) and when an individual is not recognized by its nestmates, it is promptly inspected. This is followed by varying degrees of hostility (Della Lucia *et al.* 2001; Whitehouse & Jaffé 1995). Therefore, aggressiveness induced by β -eudesmol is a possible consequence of the lack of recognition among nestmates or interference on this process. In ants, this system involves chemical cues on the body surface and cuticular hydrocarbons (Wagner 2000). Marsaro *et al.* (2004) suggested that β -eudesmol might interfere on the colony recognition because it either changes cuticular hydrocarbon composition or it blocks olfactory receptors. Masking substances involved in recognition of leaf-cutter ants were also reported by North *et al.* (2000) after caryophyllene application in *A. sexdens rubropilosa*. These authors reported an agonistic behavior among nestmates when they were exposed to the product. An alternative to the hypothesis of interference on the recognition system is that β -eudesmol as well as caryophyllene (North *et al.* 2000) would act as an alarm substance so that nestmates would lose orientation capacity at the foraging arena and aggression would be elicited.

Regarding the time to start aggression, it lasted from about 3.0 to 7.0 min for *A. sexdens rubropilosa* and *A. bisphaerica*, whereas in *A. laevigata* this time was much shorter (41 to 62

seconds). Aggression lasted 34 to 64 minutes; 34 to 82 minutes and 12 to 20 minutes in *A. sexdens rubropilosa*, *A. laevigata* and *A. bisphaerica* respectively. *A. laevigata*, despite its fast response to β -eudesmol, did not sustain the aggressive behavior for long, unlike *A. sexdens rubropilosa*.

It is important to emphasize that there are several difficulties facing studies to unravel the mechanisms involved in the deleterious behavior induced by this product. First of all, the ants not always show a behavioral pattern after exposed to β -eudesmol, as evidenced by *A. laevigata* and the grass-cutter *A. bisphaerica*. The variability of aggressive response can also be observed in the time for aggression and its duration even in the case of *A. sexdens rubropilosa*, where β -eudesmol had a strong effect. This was also reported by North *et al.* (2000) with cariophyllene.

The fact that β -eudesmol is very volatile imposes some difficulty on the investigation. It is known that this product has antimicrobial properties, especially antifungal effects (Kordali *et al.* 2005; Yonzon & Lee 2005). Maybe it has to be promptly removed from the colony by the workers. However, this still does not explain nestmate aggression. In addition, topical application was not of any help in elucidating the β -eudesmol mode of action; in the same way, cariophyllene did not work in topical application (North *et al.*, 2000). Nonetheless, β -eudesmol brings about a behavioral alteration in *Atta* that culminates with colony disruption and deserves further studies because it might represent an additional control tactic of these pest ants.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors express their gratitude to Dr. Ricardo Della Lucia, Federal University of Viçosa, MG, Brazil, for valuable comments and revision of this manuscript.

REFERENCES

- Banks, W. A., C. S. Lofgren, D. P. Jouvenaz, C. E. Stringuer, P. M. Bishop, D. F. Williams, D. P. Wojcik & B. M. Glancey 1981. Techniques for collecting, rearing, and handling imported fire ants. USDA, SEA, AATS-S-21, 9 p.
- Bigi, M. F. M. A., V. L. V. Torkomian, S. T. C. S. Groote, M. J. A. Hebling, O. C. Bueno, F. C. Pagnocca, J. B. Fernandes, P. C. Vieira & M. F. G. F. Silva 2004. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. *Pest Management Science*, 60: 933-938.
- Della Lucia, T. M. C., E. F. Vilela, N. Anjos & D. D. O. Moreira 1993. Criação de formigas cortadeiras em laboratório. *In: As Formigas Cortadeiras*. Della Lucia T. M. C. ed. Folha de Viçosa: Viçosa, MG, Brazil, pp. 151-162.
- Della Lucia, T. M. C., E. F. Vilela, D. D. O. Moreira 2001. Feromônios de formigas pragas. *In: Feromônios de insetos*. Vilela, E. F. & T. M. C. Della Lucia eds. Holos: Ribeirão Preto, Brazil, pp. 73-82.
- Hebling, M. J. A., O. C. Bueno, F. C. Pagnocca, O. A. Silva & P. S. Maroti 2000a. Toxic effects of *Canavalia ensiformes* L. (Leguminosae) on laboratory colonies of *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae) *Journal Applied Entomology*, 124: 33-35.
- Hebling, M. J. A., O. C. Bueno, P. S. Maroti, F. C. Pagnocca & O. A. Silva 2000b. Effects of leaves of *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) on nest development and respiratory metabolism of leaf-cutting ants *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae). *Journal Applied Entomology*, 124: 249-252.
- Hubbel, S. P., D. F. Wiemer & A. Adejare 1983. An antifungal terpenoid defends a Neotropical tree (Hymeneae) against attack by fungus-growing ant (*Atta*). *Oecologia*, 60: 321-327.
- Kordali, S. A. Cakir, A. Mavi, H. Kilic & A. Yildirim 2005. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1408-1416.

- Lenoir, A., D. Fresneau, C. Errard, A. Hefetz 1999. Individuality and colonial identity in ants: the emergence of the social representation concept. *In: Information Processing in Social Insects*. Detrain, C., J. L. Deneuborg, J. M. Pasteels eds. Birkhäuser Verlag Basel: Switzerland, pp. 219-237.
- Marinho, C. G. S., T. M. C. Della Lucia, R. N. Guedes, M. M. R. Ribeiro & E. R. Lima 2005. β -eudesmol-induced aggression in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 117 (1): 89-93.
- Marsaro Jr., A. L., R. C. Souza, T. M. C. Della Lucia, J. B. Fernandes, M. F. G. F. Silva & P. C. Vieira 2004. Behavioral changes in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. *Journal of Chemical Ecology*, 30(9): 1771-1780.
- North, R. D., P. E. House & C. W. Jackson 2000. Agonistic behavior of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* elicited by caryophyllene. *Journal of Insects Behavior*, 13(1): 1-13.
- Santana, D. L. Q., T. M. C. Della Lucia & J. C. Zanuncio 1990. Influência do formato de amostras de folhas de *Eucalyptus* spp. na atratividade a formigas cortadeiras *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 19: 72-80.
- Vinson, S. B. & W. P. MacKay 1990. Effects of the fire ant, *Solenopsis invicta*, on the electrical circuits and equipment. *In: Applied myrmecology: A world perspective*. Vander Meer, R. K., K. Jaffé & A. Cedeno eds. Westview Press: Boulder, pp. 496-503.
- Wagner, D., M. Tissot, W. Cuevas & D. M. Gordon 2000. Harvester ants utilize cuticular hydrocarbons in nestmate recognition. *Journal of Chemical Ecology*, 26(10): 2245-2257.
- Whitehouse, M. E. A. & K. Jaffé 1995. Nestmate recognition in the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Insectes Sociaux*, 42: 157-166.
- Williams, D. F. & R. D. deShazo 2004. Biological control of the fire ants: an update on techniques. *Annals of Allergy, asthma & immunology*, 93: 15-22.
- Yonzon, M., D. J. Lee, T. Yokochi, Y. Kawano & T. Nakahara 2005. Antimicrobial activities of essential oils of Nepal. *J Essent Oil Res.*, 17: 107-111.

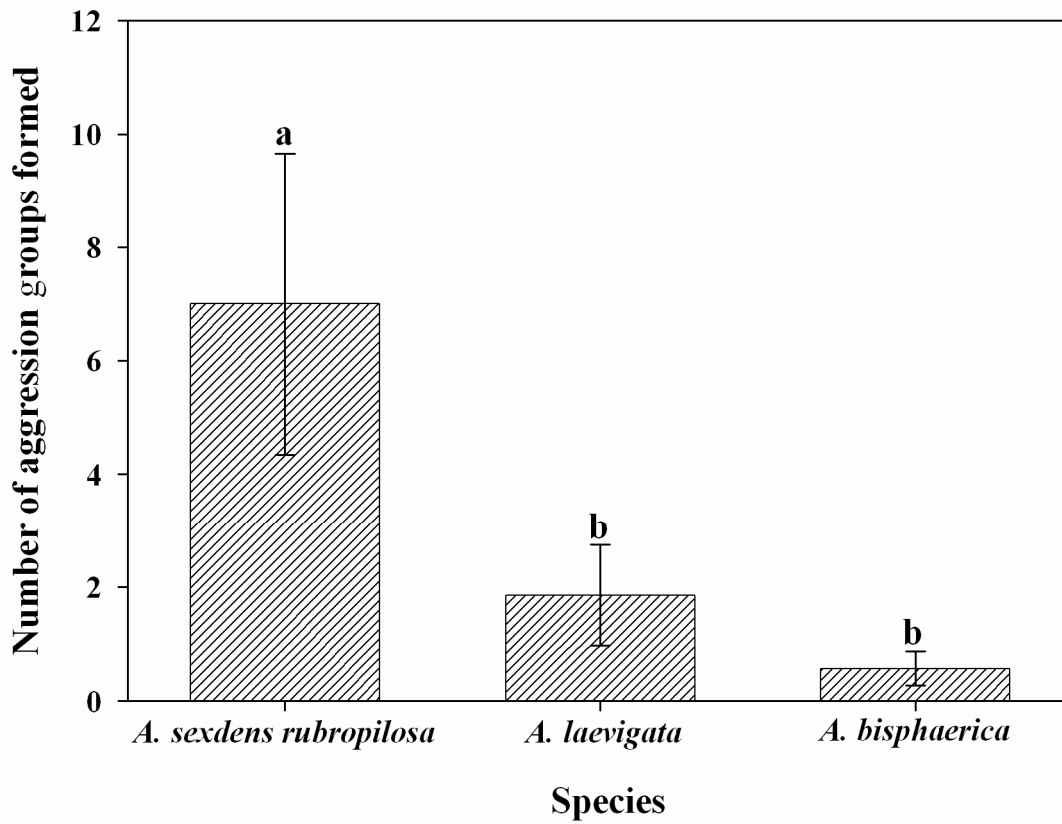


Fig. 1. Number of aggression groups formed (\pm SE) by colonies of three ant species (genus *Atta*) when exposed to β -eudesmol. Means followed by the same letter are not significantly different by Fisher's least significant difference test ($p < 0.05$).

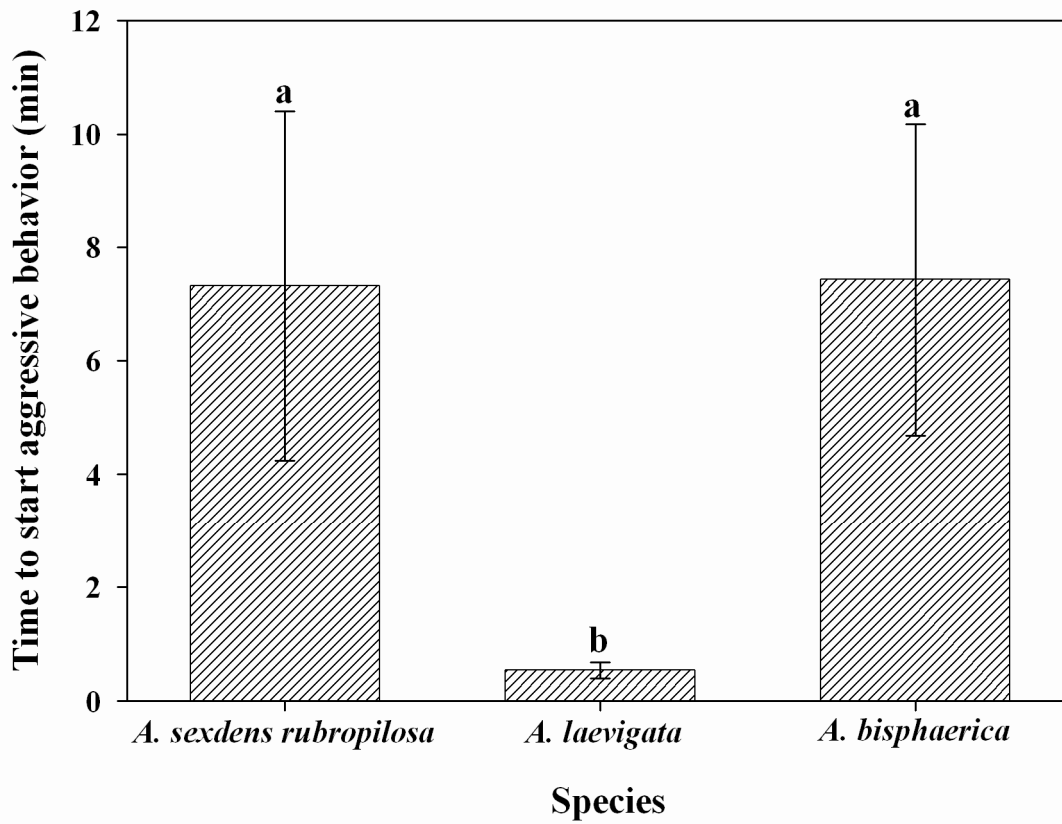


Fig. 2. Time to start aggressive behavior (min) (\pm SE) by workers from colonies of three ant species (genus *Atta*) when exposed to β -eudesmol. Means followed by the same letter are not significantly different by Fisher's least significant difference test ($p < 0.05$).

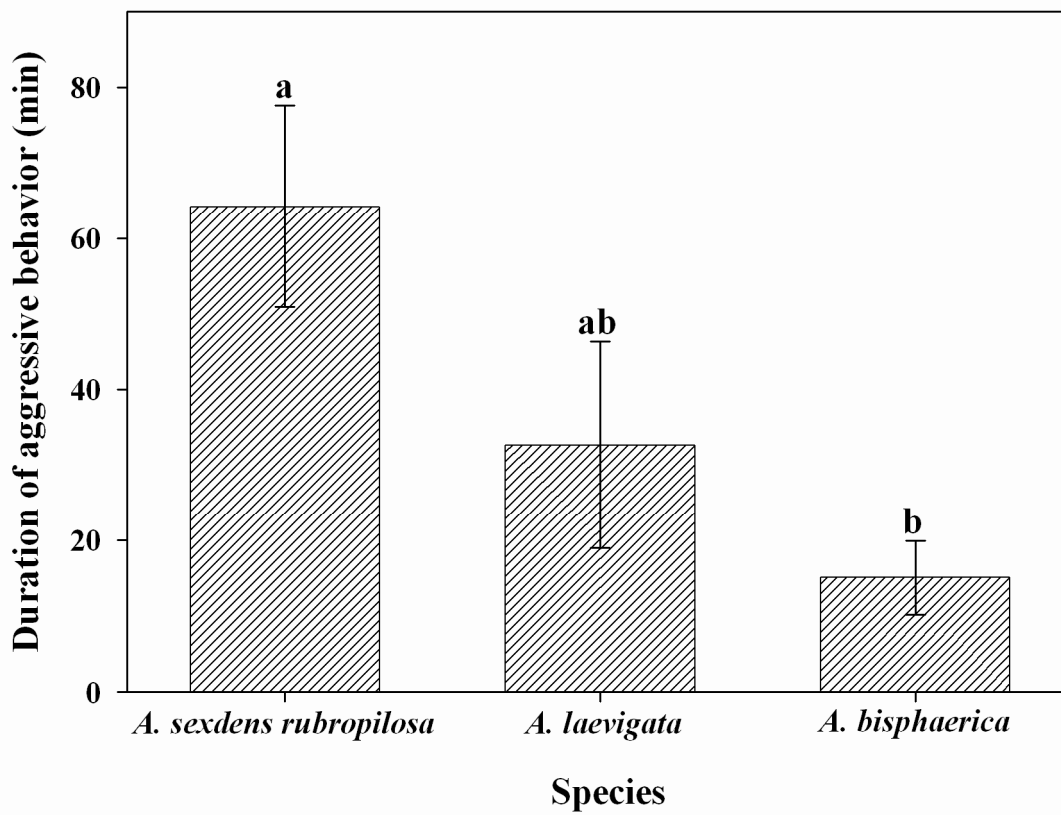


Fig. 3. Duration of aggressive behavior (min) (\pm SE) in colonies of three ant species (genus *Atta*) when exposed to β -eudesmol. Means followed by the same letter are not significantly different by Fisher's least significant difference test ($p < 0.05$).

CAPÍTULO 3

Interferência do β -eudesmol no reconhecimento entre companheiras de ninho de *Atta sexdens rubropilosa*

RESUMO

Estudos prévios demonstraram que operárias de *Atta sexdens rubropilosa* ao terem contato com o sesquiterpeno β -eudesmol, que é encontrado em folhas de *Eucalyptus maculata*, iniciam comportamento agressivo entre as suas companheiras de ninho. Este fato merece ser investigado considerando que esta espécie de saúva é de grande importância econômica. Este trabalho teve como objetivo determinar o mecanismo pelo qual essa substância desencadeia a alteração comportamental em colônias de *A. sexdens rubropilosa*. Os resultados encontrados revelaram que o β -eudesmol é um produto que pode interferir com a ação do feromônio de alarme, desencadeando a agressão. Verificou-se também que essa substância tem a capacidade de modificar a composição cuticular das operárias, dificultando o reconhecimento por parte das suas companheiras de ninho desencadeando a agressão.

Palavras-chave: *Eucalyptus maculata*, formigas cortadeiras, comportamento agressivo, feromônio de alarme, hidrocarbonetos cuticulares.

INTRODUÇÃO

Compostos do metabolismo secundário das plantas constituem uma das principais causas de rejeição de vegetais no campo pelas formigas cortadeiras (Hubbell e Wiemer, 1983). Este fato é de especial interesse uma vez que este inseto é considerado um dos herbívoros dominantes na região Neotropical (Hölldobler e Wilson, 1990). Neste sentido, alguns trabalhos têm sido feitos com o objetivo de determinar quais substâncias, presentes nas plantas evitadas pelas cortadeiras, seriam responsáveis por essa rejeição (Hubbell *et al.*, 1983; Bigi *et al.*, 2004; Marsaro *et al.*, 2004; Morini *et al.*, 2005).

O *Eucalyptus maculata* (Myrtaceae) é uma espécie de vegetal evitada pelas formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* (saúva limão) e *Atta laevigata* (saúva cabeça de vidro) (Santana e Anjos, 1989) nos reflorestamentos. Num estudo com colônias destas saúvas em laboratório, Anjos e Santana (1994) relataram que folhas de *E. maculata* oferecidas na arena de forrageamento provocaram alteração comportamental entre as operárias companheiras de ninho, caracterizada pela formação de grupos em agressão que culminavam em mutilação e morte. Marsaro Jr. *et al.* (2004) determinaram que o β -eudesmol é a principal substância responsável por esse comportamento agressivo em operárias de *A. sexdens rubropilosa*, e ressaltam ainda que essa substância interfere no reconhecimento das companheiras de ninho promovendo a agressão.

Marinho *et al.* (2005) avaliaram o efeito do β -eudesmol sintético em colônias daquela subespécie de saúva e constataram efeito semelhante ao produto natural. No entanto, Marinho *et al.* (no prelo) não observaram tal reação agressiva em colônias de *Acromyrmex subterraneus molestans* e *Ac. subterraneus subterraneus* e *Solenopsis invicta*, demonstrando assim que, esse produto tem ação específica para o gênero *Atta*. Esses mesmos autores relataram que quando o β -eudesmol foi testado em colônias de *Atta bisphaerica* e *A. laevigata*, o comportamento agressivo ocorreu em menor intensidade quando comparado aos testes realizados com *A. sexdens*

rubropilosa, pois o número de grupos em agressão formados bem como o tempo de duração da agressão, foi menor.

Comportamento semelhante exibido por operárias da mesma subespécie de formiga cortadeira foi observado por North *et al.* (2000) frente ao cariofileno, originalmente extraído de folhas de *Hymenaea courbaril*. Estes autores não conseguiram explicar como a substância age sobre as operárias. Eles sugeriram que o cariofileno estaria mascarando as substâncias químicas envolvidas no reconhecimento, mas os resultados dos seus testes foram inconclusivos. Ainda sugeriram, mas não testaram, que a reação de agressividade poderia ser explicada como resposta a uma substância que simularia o feromônio de alarme liberado pelas operárias, ou seja ao cariofileno.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo investigar o modo de ação do β -eudesmol no desencadeamento da agressividade entre companheiras de ninho de *A. sexdens rubropilosa*. Para isso, duas hipóteses foram testadas. A primeira é que o β -eudesmol interfere com a ação do feromônio de alarme aumentando seu efeito na colônia. A segunda hipótese é que o β -eudesmol interfere no reconhecimento de companheiras de ninho, alterando a composição dos hidrocarbonetos cuticulares das operárias, as quais adquirem um odor diferente daquele original da colônia.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Obtenção e manutenção das colônias de *Atta sexdens rubropilosa*

Foram utilizadas cinco colônias de *A. sexdens rubropilosa*, com cerca de oito anos de idade e 27L de jardim de fungo. Estas colônias foram mantidas em laboratório com $25\pm 5^{\circ}\text{C}$, 75 ± 10 U. R., e 12:12 (L:D), numa mesma sala durante todo o experimento (Della Lucia *et al.*, 1993). Elas recebiam diariamente um suprimento de água e folhas de diversas espécies vegetais como *Ligustrum japonicum*, *Tecoma stans*, *Acalipha wilkesiana*, *Rosa* sp. e cereais.

2. Bioensaios

Partiu-se do pressuposto que operárias impedidas de liberar o feromônio de alarme, quando em contato com o β -eudesmol, provocariam menor agressão do que aquelas que liberam o feromônio de alarme, normalmente. Para isso, foram realizadas os seguintes bioensaios:

2.1. Operárias com possibilidade de liberação do feromônio de alarme

Seis horas antes de iniciar os testes as folhas foram removidas das arenas de forrageamento para evitar interferência nos resultados. Foram retiradas 80 operárias médias (cápsula cefálica entre: 3,2 – 3,8mm). Delas, 40 foram marcadas no gáster com tinta Testors® de cor amarela (utilizadas para o tratamento) e as outras 40 foram marcadas com cor laranja (controle). Após a marcação, esperou-se 15 minutos para que a tinta secasse.

Inicialmente 100 μL de solução contendo 500 μg de β -eudesmol/mL de hexano foi aplicada em um fragmente de papel-filtro de 6cm². Já no controle foi aplicado 100 μL de hexano (solvente) também em papel-filtro de 6cm². Esperou-se três minutos para que ocorresse evaporação do solvente. Após a secagem, cada um desses papel-filtro foi acondicionado em pote plástico de 500mL (7,5cm de altura e 11cm de diâmetro). As 40 formigas marcadas de amarelo foram colocadas por 15 minutos no pote contendo o papel filtro impregnado com o β -eudesmol.

Já as 40 formigas marcadas de laranja foram colocadas por 15 minutos no pote contendo papel-filtro impregnado apenas com o solvente.

Após esse tempo de contato das formigas com o produto ou o solvente, duas formigas eram simultaneamente colocadas na arena de forrageamento, sendo uma do tratamento e uma do controle. Durante três minutos observou-se o número de formigas que atacavam as recém colocadas na arena e o número de mordidas.

Usou-se três horas como tempo máximo para avaliação deste bioensaio. Este tempo foi determinado em ensaios preliminares em que se verificou que com tempo superior a este, formigas colocadas em contato com o papel-filtro tratado não respondiam mais ao β -eudesmol. Assim, foram realizadas 40 repetições, uma vez que a avaliação destas demandou duas horas e 50 minutos.

2.2. Operárias impossibilitadas de liberar do feromônio de alarme

No bioensaio foram utilizadas também 80 formigas por colônia (40 para o tratamento e 40 para o controle). Após a retirada das formigas das suas colônias, realizou-se a marcação destas e após a secagem da tinta (15 minutos), o aparelho bucal de cada uma delas foi vedado com cola entomológica do tipo Stick. Logo após a colagem, colocou-se as formigas em contato com os fragmentos de papel do mesmo modo conforme o teste anterior (sem cola). Após os 15 minutos de contato das formigas com os papéis (tratamento e controle) iniciou-se os testes. Duas formigas (uma do tratamento e uma do controle) foram colocadas simultaneamente na arena de forrageamento e observou-se durante três minutos, o número de formigas que atacaram e o número de mordidas. Ao final dos três minutos as duas formigas eram retiradas da arena de forrageamento e descartadas, iniciando assim, uma nova repetição, totalizando 40 repetições em cada uma das cinco colônias.

3. Avaliação da composição cuticular das formigas

3.1. Extração dos componentes cuticulares

Para a determinação da composição química da cutícula de operárias de *A. sexdens rubropilosa*, na presença e na ausência de β -eudesmol, foram coletadas 80 operárias médias de cada uma das cinco colônias. Destas, 40 foram colocadas em um recipiente com um papel-filtro impregnado com β -eudesmol e a outra metade colocada em um recipiente com um papel-filtro com hexano. Estas operárias foram colocadas em 3 ml de hexano por 1 hora, com leve agitação a cada 20 minutos. Após este período, as formigas foram removidas e o líquido foi analisado (adaptado de Souza, 2004).

3.2. Identificação dos componentes cuticulares

Os extratos coletados foram injetados em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (CG/MS) Shimadzu QP5000, usando uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) contendo um filme de 95% de dimetilsiloxano e 5% de difenil (Equity-5 fase estacionária, Equity). Hélio foi utilizado como gás carreador (fluxo linear de 1,6 ml/min., pressão na coluna de 100 kPa). O espectrômetro de massas foi ajustado para fazer varreduras de massas a partir de m/z 29 até 470 para a análise de hidrocarbonetos e de m/z 29 até 600 para derivados de dimetil disulfeto (DMDS). Para todas as análises a temperatura da interface do CG/EM foi mantida a 270 °C. A temperatura inicial do forno foi de 60°C por 3,0 min., elevada até 270 °C a uma taxa de 8,0 °C/min., e mantida nesta temperatura por 30 min. Os dados dos derivados de DMDS foram obtidos na mesma coluna Equity-5, sendo a temperatura inicial do forno de 100, elevada até 270 °C a uma taxa de 10,0 °C/min., e mantida por 40 min.

Alíquotas de 1µl foram injetadas (modo “splitless”), conforme Attygalle *et al.* (no prelo) com modificações.

Os derivados de DMDS foram formados conforme previamente descrito (Buser *et al.* 1983; Attygalle *et al.* 1996). Desta forma, foram adicionados ao extrato hexânico de operárias e de cabeça de operárias (300 µl), a uma solução de iodo em éter dietílico destilado (10 µl; 5%) e a dimetil disulfido destilado (200 µl; Aldrich Chemicals). As misturas das reações foram colocadas no escuro e a temperatura ambiente por 18 horas. Em seguida, estas foram descolorizadas com duas a três gotas de uma solução de tiosulfato de sódio (5%), e os produtos foram extraídos com 200 µl e repetido mais duas vezes com 300 µl. A fase orgânica foi evaporada com N₂ até a completa evaporação do hexano. O resíduo foi redissolvido com 600 µl de hexano.

Os hidrocarbonetos saturados foram identificados pela comparação com os tempos de retenção dos padrões dos hidrocarbonetos (C8-C25, C26, C28-C30, C32, C34 e C36). Os hidrocarbonetos insaturados foram identificados pelo seu espectro de massa dos seus derivados DMDS (Francis e Veland, 1981). Além disto ainda foram identificados outros compostos quando comparado com tabelas apropriadas com base no Índice de Kovat's calculado para cada substância detectada, (Adams, 1995). Os demais foram indicados em forma de probabilidade, conforme comparações feitas pelo programa do CG/EM QP-5000 com a biblioteca Willey 229.

O Índice de Kovat's (I) foi calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$$I = 100 * Z + 100 * ((\log t'_{RX} - \log t'_{RZ}) / (\log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{RZ}))$$

onde:

I= número hipotético, que é igual ao número de átomos de carbono de um alceno saturado de cadeia normal, que tem o mesmo tempo de retenção ajustado (t'_R) que o composto cujo índice está sendo determinado;

Z= número de carbonos de um alceno saturado normal;

t'_{RX} = tempo de retenção ajustado do composto X;

t'_{RZ} e $t'_{R(Z+1)}$ = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal, sendo que t'_{RX} é o intermediário a t'_{RZ} e $t'_{R(Z+1)}$.

4. Análises estatísticas

Os bioensaios realizados com as operárias contaminadas e não contaminadas com o β -eudesmol nas suas respectivas colônias foram sujeitas a análise não-paramétrica utilizando o teste Wilcoxon.

As áreas dos picos obtidos dos cromatogramas, nas análises químicas da cutícula das formigas foram transformadas para $\log_{10}(x+1)$ visando a homogeneização das variâncias. Análise de variáveis canônicas foi usada para verificar se as substâncias encontradas na cutícula das formigas que tiveram contato com o β -eudesmol eram diferentes daquelas encontradas em formigas que não tiveram contato com ele (PROC CANDISC; SAS Institute 2001).

RESULTADOS

1. Bioensaios

1.1. Operárias com possibilidade de liberação do feromônio de alarme

Os resultados indicaram que formigas contaminadas com o β -eudesmol e oferecidas às suas colônias de origem provocaram comportamento agressivo nas suas companheiras de ninho, pois a formiga contaminada recebeu um número maior de ataques, bem como um número maior de mordidas do que o controle (Figs. 1a e 1b). O comportamento agressivo foi caracterizado inicialmente por inspeção, seguida de movimentos bruscos, mordidas em diversas partes do corpo, mutilações, e ainda algumas foram transportadas para a o depósito de lixo do ninho.

1.2. Operárias impossibilitadas de liberar do feromônio de alarme

Neste experimento também foi observado o comportamento agressivo entre as companheiras de ninho que tiveram contato com o β -eudesmol. Formigas que tiveram a boca colada e que tiveram contato com o β -eudesmol foram mais agredidas do que as formigas com a boca colada, porém sem contato com o β -eudesmol (Figs. 2a e 2b).

1.3. Formigas impossibilitadas de liberar feromônio de alarme X formigas liberando feromônio de alarme

Quando se confrontou os resultados obtidos no primeiro bioensaio (mandíbulas sem cola) com os do segundo bioensaio (mandíbulas coladas) e que tiveram contato com o β -eudesmol, a análise estatística revelou que formigas com a boca não colada foram mais agredidas do que as formigas com a boca colada (Figs. 3a e 3b).

2. Perfil químico da cutícula das formigas

A análise do perfil químico da cutícula das formigas mostrou que formigas que tiveram contato com o β -eudesmol apresentavam uma composição cuticular diferente daquelas que não tiveram contato com esse produto. A análise de variância multivariada indicou diferença significativa entre o perfil de hidrocarbonetos entre formigas contaminadas ou não com o β -eudesmol ($p < 0,05$). Subseqüente análise de variáveis canônicas gerou um eixo canônico significativo correspondendo a 99% da variância observada no experimento. As cargas canônicas deste eixo indicam que os picos, 11, 19 e 23 foram os principais responsáveis pelo perfil diferenciado obtido com a exposição ao β -eudesmol. As áreas destes picos foram sujeitas posteriormente à análise de variância, confirmando serem eles significativamente diferentes para formigas expostas ou não ao β -eudesmol (pico 11: $GL_{\text{erro}}=8$; $F=6,00$; $P=0,040$, pico 19: $GL_{\text{erro}}=8$; $F=5,99$; $P=0,041$, e o pico 23: $GL_{\text{erro}}=8$; $F=5,99$; $P=0,041$). Estes picos foram identificados como (*E*)-beta-farneseno (Adams, 1995) (pico 11), Bulsenol (Adams, 1995) (pico 19) e (*E,E*) farnesol (Adams, 1995) (pico 23).

Não foram encontrados hidrocarbonetos com dupla ligação.

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados neste estudo demonstram que operárias de *A. sexdens rubropilosa*, quando em contato com o β -eudesmol sofrem alteração comportamental. Essas, ao entrarem em contato com as outras formigas que permaneceram nas suas colônias de origem, desencadeiam comportamento agressivo. De acordo com Lenoir *et al.* (1999) cada colônia apresenta seu odor específico e quando um odor estranho é percebido, as formigas irão responder a este estímulo com um comportamento agressivo.

O mesmo resultado foi encontrado quando formigas que tiveram as suas mandíbulas impedidas de liberar o feromônio de alarme. Contudo, estas foram menos agredidas do que as de mandíbulas em condições de liberar o feromônio de alarme (mandíbulas não coladas) (Figs. 1 a 3). O comportamento agressivo observado neste estudo era esperado, pois em trabalhos anteriores foi verificado um comportamento semelhante nesta espécie de cortadeira (Marsaro *et al.* 2004; Marinho *et al.* 2005). North *et al.* (2000) em estudos com esta mesma saúva, porém com uma outra substância (cariofileno) que também desencadeia comportamento agressivo entre as companheiras de ninho, levantaram a hipótese de que a substância agiria como o feromônio de alarme desencadeando a agressão. Este tipo de feromônio é produzido pelas glândulas mandibulares as quais estão localizadas na base das mandíbulas, sendo liberado para fora do corpo da formiga através de um ducto (Hölldobler e Wilson, 1990; Billen e Morgan, 1998). Ele é altamente volátil e dispersado rapidamente no ar, alertando as companheiras de algum perigo (Caetano *et al.* 2002).

O fato de que formigas que tiveram as suas mandíbulas coladas terem sofrido menor agressão (Figs. 1 a 3) poderia reforçar a hipótese de North *et al.* (2000). Isso quer dizer que a imobilização das mandíbulas nas operárias poderia impedir a liberação do feromônio de alarme ou dificultar a dispersão do mesmo, e assim resultando em agressividade menos intensa. Esses resultados sugerem que o β -eudesmol age sinergicamente com o feromônio de alarme.

Outra possibilidade para a alteração do comportamento é de que modificações na cutícula das formigas, promovidas pelo β -eudesmol, interfiram no reconhecimento entre as companheiras de ninho desencadeando, assim, a agressão. Esta hipótese tem suporte nas diferenças observadas na composição cuticular das formigas tratadas com o β -eudesmol em relação ao controle (Fig. 4). De acordo com esses resultados, formigas que tiveram contato com o β -eudesmol apresentaram uma composição cuticular diferente daquelas que não tiveram contato com ele, ou seja, de alguma maneira essa substância promoveu a modificação do perfil químico da cutícula das formigas. Sabe-se que cada indivíduo tem um rótulo ou um conjunto de códigos, um mecanismo para detecção e interpretação do rótulo de outro indivíduo e ainda um modelo de códigos armazenados na memória (Vander Meer e Morel, 1998). Portanto, quando o código encontrado não confere com aquele armazenado, o indivíduo não é reconhecido, resultando na agressão.

Estudos com *Linepithema humile* demonstraram que formigas que tiveram contato rápido (cerca de dois minutos) com uma presa provocaram comportamento agressivo entre as suas companheiras de ninho e foi comprovado através de análises da cutícula dessas formigas e da sua presa que esse breve contato provocou a modificação da composição da sua cutícula. Desse modo, suas companheiras de ninho não reconheceram o odor modificado, resultando em agressão (Liang *et al.*, 2001). Embora *L. humile*, espécie dominante de solo, ou serapilheira e onívora (Delabie *et al.* 2000), não apresente características comuns com *A. sexdens rubropilosa* no que diz respeito a sua biologia e comportamento, essas explicações para o comportamento agressivo podem ser semelhantes.

Neste trabalho, verifica-se que a agressão entre companheiras de ninho deve-se tanto à interferência no sistema de alarme (feromônio) quanto à ocorrência de modificações na cutícula, ou seja, o β -eudesmol parece agir em ambos os sistemas simultaneamente. O mecanismo pelo qual esse produto desencadeia a agressividade ainda precisa ser melhor compreendido. O fato é que, não se encontram na literatura, referências que objetivam explicar como substâncias

similares atuam no comportamento das cortadeiras. Aliado a isso existe outro problema que dificulta essas investigações: a variação entre colônias com relação as respostas comportamentais encontradas nos experimentos realizados. Este aspecto também foi relatado por North *et al.* (2000) com o cariofileno, em que colônias mantidas sob as mesmas condições, exibem respostas diferenciadas nos bioensaios. Isto, inclusive, traz sérias implicações para o futuro no manejo das cortadeiras.

Em conclusão, o β -eudesmol é uma substância que modifica o comportamento de formigas de uma mesma colônia, promovendo um desarranjo no reconhecimento das companheiras de ninho. Provavelmente isso ocorre em consequência da modificação da composição da cutícula das formigas e também interferência (sinergismo) com o feromônio de alarme, que ocorre quando as formigas entram em contato com esse produto.

AGRADECIMENTO

A autora agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro na realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

- Adams, P. R. (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography/Mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.
- Attygalle, A. B., Gulab, N. J., Morgan, E. D. (No prelo). Contents of the hypertrophied postpharyngeal gland of workers and soldiers of the fire ant *Solenopsis geminate* (Hymenoptera: Myrmicinae). Sociobiology.
- Attygalle, A. B., Jham, G. N., Svatos, A., Frighetto, R. T., Meinwald, J., Vilela, E. F., Ferrara, F. A. (1996). (3E, 8Z, 11Z)-3,8,11-Tetradecatrienyl acetato: A major component of sex pheromone of tomato pest *Scrobipalpuloides absoluta*. Biorganic and Medicinal Chemistry. **4**: 305-314.
- Anjos, N., Santana, D. L. Q. (1994). Alterações deletérias no comportamento de *Atta laevigata* (F. Smith) e *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae), causadas por folhas de *Eucalyptus* spp. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. **23**: 25-30.
- Bigi, M. F. M. A., Torkomian, V. L. V., Groote, S. T. C. S., Hebling, M. J. A., Bueno, O. C., Pagnocca, F. C., Fernandes, J. B. P., Vieira, C., Silva, M. F. G. F. (2004). Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. Pest Management Science. **60**: 933-938.
- Billen, J., Morgan, D. (1998). Pheromone communication in social insects: sources and secretions. In Vander Meer, R. K. (ed.), Pheromone communication in social insects. Boulder: Westview, pp.3-33.
- Buser, H. R., Arn, H., Guerin, P. A., Rauscher, S. (1983). Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfide adducts. Analytical Chemistry. **55**: 818-822.
- Caetano, F. H., Jaffé, K., Zara, F. J. (2002). Formigas: biologia e anatomia, Caetano, F. H., Rio Claro.
- Delabie, J. H. C., Agosti, D., Nascimento, I. C. (2000). Litter ant communities of the Brazilian Atlantic rain forest region. In Agosti, D., Majer, J. D., Alonso, L., Schultz, T. (eds.), Sampling ground-dwelling ants: case studies from the worlds' rain forests. (S. l.): School of Environmental Biology, (Bulletin,18).
- Della Lucia, T.M.C., Vilela, E.F., Anjos, N., Moreira, D. D. O. (1993). Criação de formigas cortadeiras em laboratório. In Della Lucia, T. M. C. (ed.), As Formigas cortadeiras, Folha de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil, pp. 151-162.
- Della Lucia, T. M. C., Vilela, E. F., Moreira, D. D. O. (2001). Feromônios de formigas pragas. In Vilela, E. F., Della Lucia, T. M. C. (eds.), Feromônios de insetos, Holos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, pp. 73-82.
- Francis, G. W., Veland, K. (1981). Alkylthiolation for the determination of double-bond position in linear alkenes. Journal of Chromatography. **219**: 379-384.
- Hölldobler, B., Wilson, E. O. (1990). The ants, Springer-Verlag, Berlin.
- Hubbell, S. P., Wiemer, D. F. (1983). Host plant selection by an Attini ant. In Jaisson, P. (ed.), Social Insects in the tropics, University of Paris, Paris, v. 2, pp. 133-154.
- Hubbell, S. P., Wiemer, D. F., Adejare, A. (1983). An antifungal terpenoid defends a Neotropical tree (Hymeneae) against attack by fungus-growing ant (*Atta*). Oecologia. **60**: 321-327.

- Lenoir, A., Fresneau, D., Errard, C., Hefetz, A. (1999). Individuality and colonial identity in ants: the emergence of the social representation concept. In Detrain, C., Deneuborg, J.L., Pasteels, J. M. (eds.), *Information Processing in Social Insects*, Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, pp. 219-237.
- Liang, D., Blomquist, G. J., Silverman, J. (2001). Hydrocarbon-released nestmate aggression in the Argentine ant, *Linepithema humile*, following encounters with insect prey. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **129**: 871-882.
- Marinho, C. G. S., Della Lucia, T. M. C., Guedes, R. N. C., Ribeiro, M. M. R., Lima, E. R. (2005). β -eudesmol-induced aggression in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **117**: 89-93.
- Marinho, C. G. S., Ribeiro, M. M. R., Della Lucia, T. M. C., Guedes, R. N. C. (2006). Aggressive response of pest ant species to β -eudesmol (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. (No Prelo).
- Marsaro, Jr. A. L., Souza, R. C., Della Lucia, T. M. C., Fernandes, J. B., Silva, M. F. G. F., Vieira, P. C. (2004). Behavioral changes in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. *Journal of Chemical Ecology*. **30**: 1771-1780.
- Morini, M. S. C., Bueno, O. C., Bueno, F. C., Leite, A. C., Hebling, M. J. A., Pagnocca, F. C., Fernandes, J. B., Vieira, P. C., Silva, M. F. G. F. (2005). Toxicity of sesame seed to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. **45**: 195-204.
- North, R. D., House, P. E., Jackson, C. W. (2000). Agonistic behavior of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* elicited by caryophyllene. *Journal of Insects Behavior*. **13**: 1-13.
- Santana, D. L. Q., Anjos, N. (1989). Resistência de *Eucalyptus* spp. à *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Árvore*. **13**: 174-181.
- Souza, D. J. (2003). Discriminação e sobrevivência de operárias em colônias monogínicas e poligínicas de *Acromyrmex subterraneus molestans* (Hymenoptera: Formicidae). Viçosa, MG.: UFV, 82p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- SAS Institute (2001). SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6 th ed. SAS Institute, Cary, NC.Todd and Browde.
- Vander Meer, R. K., Morel, L. (1998). Nestmate recognition in ants. In Vander Meer, R. K. (ed.), *Pheromone communication in social insects*. Boulder: Westview, pp.79-103.
- Whitehouse, M. E. A., Jaffé, K. (1995). Nestmate recognition in the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Insectes Sociaux*. **42**: 157-166.

Tabela 1. Composição de química de *Atta sexdens rubropilosa* identificado por CG-MS para formigas que tiveram contato com o β -eudesmol (tratamento) e para as que não tiveram contato com o produto (controle).

Nº. pico	T. de retenção (min)	Componente	Área dos picos			
			β -eudesmol		Controle	
			Média	\pm EP	Média	\pm EP
1	10,876	Mirtenol ^c	0,370	0,026	-	-
2	11,314	Decanal (96%) ^a	1,341	0,661	0,374	0,191
3	12,038	Geraniol ^c	13,442	5,084	4,065	2,177
4	12,218	-	0,191	-	0,279	0,074
5	12,262	-	1,515	0,621	0,731	0,275
6	12,614	Geranial ^c	31,917	13,109	9,786	4,616
7	12,817	-	0,181	0,016	-	-
7A	14,883	-	-	-	0,067	-
8	15,051	Dodecanal ^c	0,448	0,204	0,107	-
9	15,822	Geranil acetona ^c	0,264	0,068	0,044	-
10	15,893	(<i>E</i>)-beta-farneseno ^c	0,324	0,066	-	-
10A	15,941	-	-	-	0,115	-
11	16,132	-	0,405	0,254	0,132	-
12	16,740	(<i>E,E</i>)-Alfa-farneseno ^c	0,126	0,009	-	-
12A	16,872	-	0,046	-	0,151	-
12B	18,149	Hexadecano (C16) ^b	-	-	0,195	-
13	18,366	Tetradecanal ^c	0,372	0,173	0,070	-
13A	18,893	-	-	-	0,051	-
14	19,173	Bulnesol ^c	0,206	0,070	-	-
14A	19,247	-	0,219	0,004	0,065	-
14B	19,652	Heptadecano (C17) ^b	-	-	0,125	-
14C	19,741	-	-	-	0,062	-
15	20,056	(<i>E,E</i>)-farnesol ^c	0,450	0,167	-	-
16	20,363	(<i>E,Z</i>)-farnesol ^c	0,122	0,036	-	-
16A	21,071	Octadecano (C18) ^b	0,116	-	0,103	-
16B	22,126	-	0,073	-	0,381	0,347
17	27,281	Tricosano (C23) ^{b,c}	0,303	0,083	0,279	0,075
18	28,374	Tetracosano (C24) ^{b,c}	0,117	0,034	0,140	0,075
19	29,438	Tetracosano (C 25) ^b	12,222	2,085	10,906	1,783
20	30,561	Hexacosano (C 26) ^b	1,106	0,230	0,935	0,185
20A	31,528	-	0,054	-	-	-
21	31,888	Heptacosano (95%) ^a	20,577	4,355	19,557	3,692
22	33,402	Octacosano (C28) ^b	0,324	0,051	0,277	0,017
23	35,275	Nonacosano (93%) ^a	4,274	1,056	3,926	0,811
24	39,225	-	0,940	0,200	1,051	0,183
24A	41,722	-	0,256	-	0,216	-
25	45,461	-	4,087	0,472	4,198	0,315
26	46,466	-	2,829	0,656	3,170	0,540
27	49,175	-	2,063	0,516	1,550	0,029

^aIdentificação sugerida com base nas comparações dos espectros de massa da biblioteca do CG-MS.

^b Identificado por comparação do tempo de retenção de padrões de hidrocarbonetos.

^c Identificado com base no Índice de Kovat's calculado para cada substância detectada em comparação com índices tabelados (Adams, 1995).

A, B e C: referente a picos que ocorreram em diferentes repetições, porém, não ocorreram na repetição utilizada para construir a tabela.

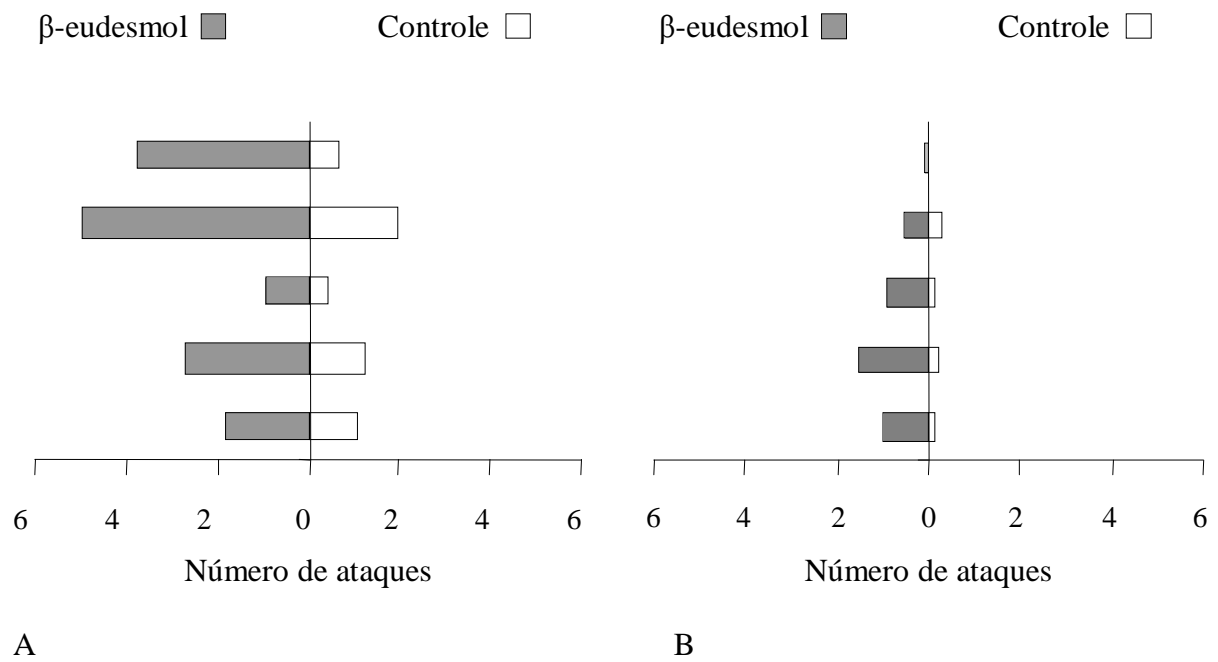


Figura 1. A) Número de formigas que atacaram a formiga contaminada pelo β -eudesmol (tratamento) e a formiga não contaminada (controle) em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* (Teste Wilcoxon; $T= 945,5$; $P<0,001$; g.l.= 199) (sem cola); e B) Número de formigas que atacaram a formiga contaminada pelo β -eudesmol (tratamento) e a formiga não contaminada (controle), ambas com a boca colada, em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* (Teste Wilcoxon; $T= 324,5$; $P<0,001$; g.l.= 199). Cada barra no gráfico representa uma colônia.

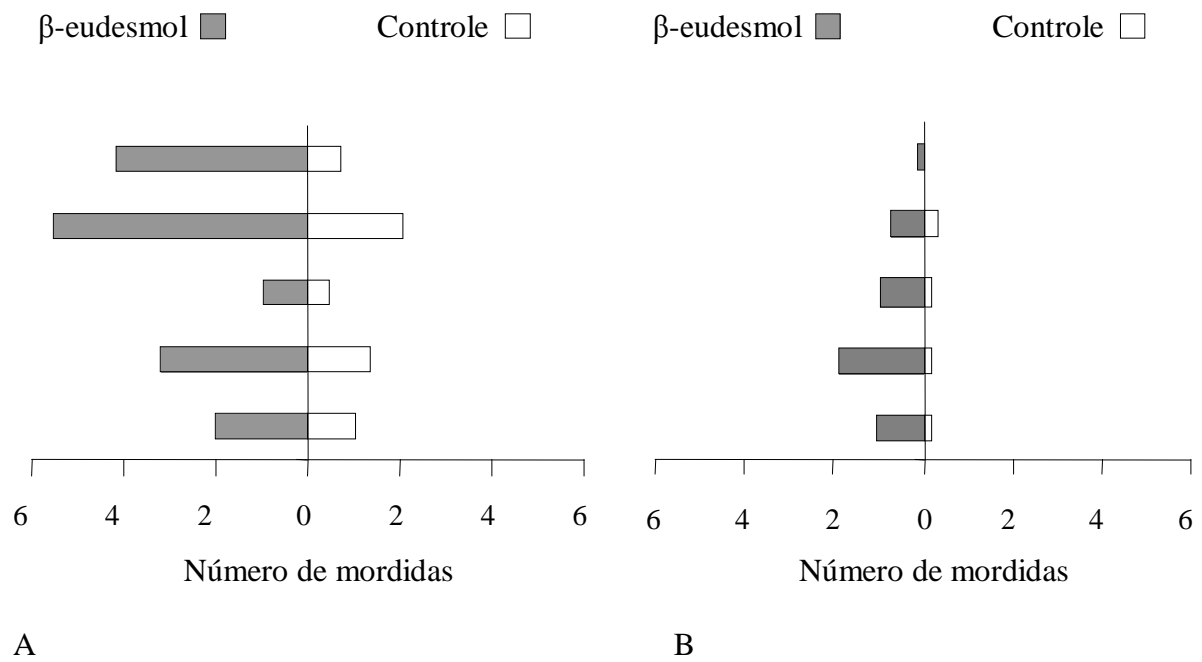


Figura 2. A) Número de mordidas recebidas pela formiga contaminada pelo β -eudesmol e a não contaminada em colônias de *A.sexdens rubropilosa* (Teste Wilcoxon; T= 826,0; P<0,001; g.l.= 199); e B) Número de mordidas recebidas pela formiga contaminada pelo β -eudesmol e a não contaminada em colônias de *A.sexdens rubropilosa*, ambas com a boca colada (Teste Wilcoxon; T= 327,0; P<0,001; g.l.= 199). Cada barra no gráfico representa uma colônia.

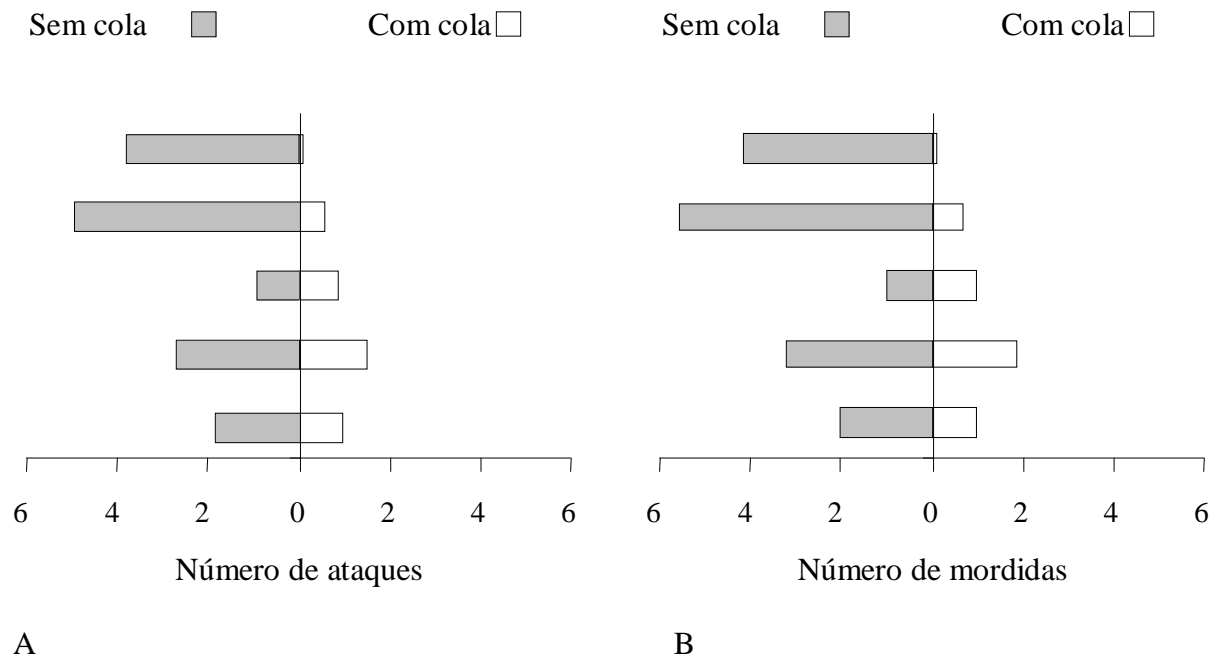


Figura 3. A) Número de formigas que atacaram a formiga contaminada pelo β -eudesmol em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* sem e com a boca colada (Teste Wilcoxon; T= 1000,0; P<0,001; g.l.= 199); e B) Número de mordidas recebidas pela formiga contaminada pelo β -eudesmol em colônias de *A.sexdens rubropilosa*, sem a boca estar colada e com a boca colada (Teste Wilcoxon; T= 1224,5; P<0,001; g.l.= 199). Cada barra no gráfico representa uma colônia.

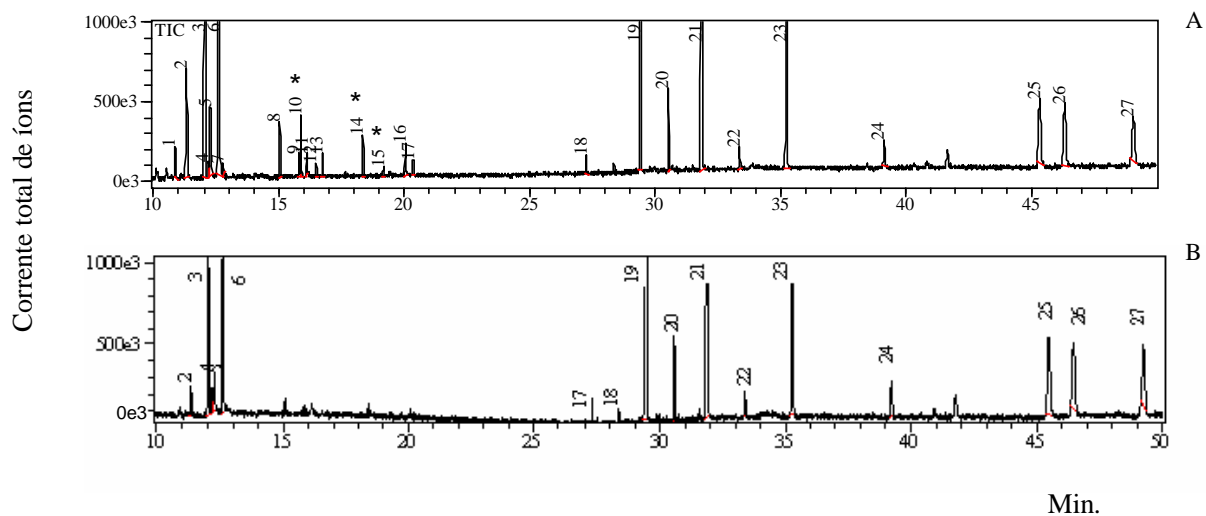


Figura 4. A) Cromatograma do perfil químico de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* que tiveram contato com o β -eudesmol; B) Cromatograma do perfil químico de operárias de *A. sexdens rubropilosa* que não tiveram contato com o β -eudesmol (Controle). Os números sobre os picos são referentes ao número do pico listado na tabela 1. * Picos que só ocorreram no tratamento.

2. CONCLUSÕES GERAIS

O sesquiterpeno, β -eudesmol, é uma substância que causa efeito deletério em colônias da cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*, sendo que este efeito foi mais intenso em colônias grandes (25L) do que nas pequenas (1,5L). O efeito deletério observado foi caracterizado por comportamento de alarme, inspeção, mordidas nas companheiras de ninho e a formação de grupos em agressão, sendo que muitas das formigas envolvidas eram mortas. A agressão, porém, só foi observada a partir da concentração de $500\mu\text{g mL}^{-1}$. Ocorreu aumento na intensidade deste comportamento apenas nas colônias grandes à medida que as concentrações aumentaram. Foi observado efeito nocivo em colônias de *A. laevigata* e *A. bisphaerica*, mas não ocorreu agressividade em *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *Ac. subterraneus molestans* e nem na lava-pé *Solenopsis invicta*.

Quanto ao mecanismo envolvido neste comportamento agressivo desencadeado pelo β -eudesmol, verificou-se que o feromônio de alarme pode estar atuando juntamente com a substância estudada provocando a agressão. Isso foi observado em experimentos onde formigas tiveram contato com o β -eudesmol e tiveram as suas bocas coladas dificultando a saída do feromônio de alarme. As que tiveram a boca colada foram menos agredidas do que as formigas do grupo controle. Torna-se, entretanto, necessária a realização de estudos adicionais utilizando este feromônio sozinho em contato com as formigas, para maiores esclarecimentos sobre qual parcela ele desempenha na indução da agressividade. Um outro fator que desencadeou a agressão

é a modificação do perfil químico do corpo das formigas, que foi verificada através de análises químicas de cromatografia. Formigas que tiveram contato com o β -eudesmol apresentaram substâncias que não ocorreram no controle ((*E*) β -farneseno, Bulsenol e o (*E,E*) farnesol). Portanto, a modificação da composição da cutícula prejudicou o reconhecimento das companheiras de ninho, resultando também na agressão. Experimentos adicionais sobre a atuação desse composto certamente contribuirão para elucidar melhor o mecanismo de ação, o qual parece complexo e possivelmente envolve uma interação de fatores. Entretanto, para que se possa constatar a viabilidade de uso do β -eudesmol no combate, diversos aspectos ainda devem ser investigados. Por exemplo, o que esse produto provocaria se aplicado na rainha? E no campo, há alguma alteração? Seria essa alteração suficiente para comprometer toda a colônia? A resposta dessas questões deverá ser meta de trabalhos futuros.