

**LUIZA CARLA BARBOSA MARTINS**

**GLÂNDULAS INTRAMANDIBULARES DE FORMICIDAE (PONERINAE,  
MYRMICINAE): DESENVOLVIMENTO E SEUS COMPONENTES  
QUÍMICOS**

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  
2012**

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

T

M386m  
2012

Martins, Luiza Carla Barbosa, 1976-  
Glândulas intramandibulares de formicidae  
(*Ponerinae*, *Myrmicinae*): desenvolvimento e seus  
componentes químicos. / Luiza Carla Barbosa Martins.  
– Viçosa, MG, 2012.  
xiii, 94f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Formigas - Morfologia. 2. Formicidae. 3. Glândulas  
exócrinas. 4. Formigas - Histologia. 5. Formiga -  
Comportamento. 6. Formiga-cortadeira. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

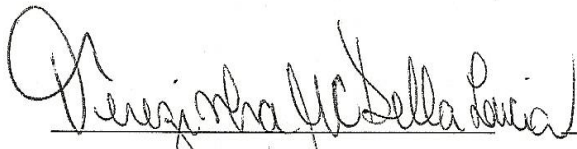
CDD 22. ed. 595.796

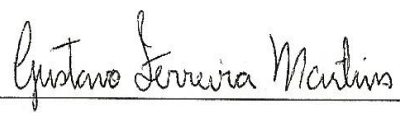
LUIZA CARLA BARBOSA MARTINS

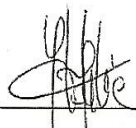
GLÂNDULAS INTRAMANDIBULARES DE FORMICIDAE (PONERINAE,  
MYRMICINAE): DESENVOLVIMENTO E SEUS COMPONENTES QUÍMICOS

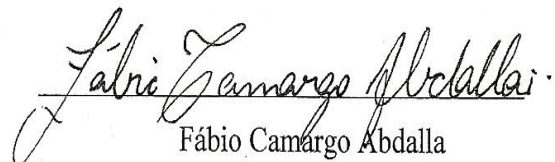
Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Entomologia, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

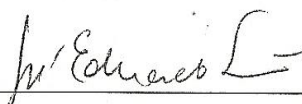
APROVADA: 25 de fevereiro de 2012.

  
Terezinha Maria C. Della Lucia

  
Gustavo Ferreira Martins

  
Jacques Hubert C. Delabie

  
Fábio Camargo Abdalla

  
José Eduardo Serrão  
(Orientador)

***“Perseverás até alcançar o êxito”***

(O G Mandino)

A meu pai Carlos, minha mãe Lourdes, a meu esposo Alex.

Aos meus irmãos e sobrinhos, com amor,

Dedico

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser a luz de minha vida.

A Universidade Federal de Viçosa, em especial, ao Departamento de Entomologia e Biologia Geral, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise, e a Dra. Cláudia Vanetti, pelo apoio técnico, disponibilidade e boa vontade.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro.

Ao meu orientador, Prof. José Eduardo Serrão, pelos ensinamentos, orientação, confiança e dedicação que me oportunizou viver e aprender muito sobre ciência e sobre a vida, e por ser um belo exemplo de profissional e amigo.

Ao Prof. Jacques H. C. Delabie por ter acreditado em mim, e me guiado desde minha iniciação científica para a realização de meus sonhos.

Aos meus coorientadores Prof. Eraldo Rodrigues Lima e Prof. José Cola Zanuncio pela disponibilidade.

Aos membros de minha banca, Prof<sup>a</sup> Terezinha Maria C. Della Lucia, Prof. Jacques H. C. Delabie, Prof. Fábio Camargo Abdalla, Prof. Gustavo Ferreira Martins, Prof<sup>a</sup> Elaine Cristina M. S. Zacarin e Prof. Clóvis Andrade Neves por aceitarem o convite para participar de minha defesa e principalmente pela grande contribuição para melhoria da qualidade da tese.

As secretárias da Entomologia, Paula, Miriam, Silvânia e Cláudia, pelo carinho e atenção com que me atenderam sempre que precisei.

As secretárias do Departamento de Biologia Geral, Beth, Diana, Rose e Salvador, pela boa vontade e disponibilidade em ajudar.

Aos amigos do laboratório de Ultraestrutura de Insetos, Dihego, Madu, Polly, Débora, Maria Aparecida, Valéria, Douglas, Wagner, Milton, pela amizade, apoio, conversas e ensinamentos, em especial a Monteiro, pelo apoio técnico e amizade que tanto me auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho.

A todos os amigos do Centro de Pesquisa do Cacau-CEPLAC, pela amizade, carinho e torcida para minha realização, a todos do Laboratório de Mirmecologia da CEPLAC, pelo apoio, incentivo, ensinamentos, e principalmente pela amizade construída, em especial a José Raimundo e José Abade pela disponibilidade para coletar.

A todos do Laboratório de Comportamento e Ecologia de Insetos Sociais, FFCLRP/USP Ribeirão Preto – SP pela receptividade, especialmente a ao Prof. Fabio S. Nascimento pela disponibilidade e concessão do uso do GC-MS, e a MSc Maria Cláudia G. Campos que se tornou uma grande amiga, por sua ajuda nas análises químicas.

Aos amigos Pollyanna, Sabrina, Marcília, Fátima, Maria, Eltamara, Aline, Raquel, Antônia, Poul, Gustavão, Tio Lala e Adebayo, minha imensa gratidão pela amizade sincera, apoio, confiança e por serem um belo exemplo de como é bom ter amigos.

A amiga Carolina Gonçalves Santos, de Ribeirão Preto pelo apoio moral e a certeza de que se possui um ombro amigo, quando estava em uma cidade na qual não conhecia ninguém, e me recebeu com muito carinho.

Ao Sr. Manoel, Myriam e Rômulo do Insetário da UFV, por se colocarem sempre disponível nos momentos que precisei, e por toda atenção e carinho.

A Ronara pela amizade, disponibilidade e auxílio nas coletas e ensinamentos de campo.

Ao MSc Paulo Fellipe Cristaldo do Lab. de Termitologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela ajuda nas análises estatística.

Ao MSc Hipólito A. E. Malia do Lab. de Ecotoxicologia pela ajuda na utilização do equipamento de vídeo rastreamento “track” e análise estatística.

A todos do grupo Subordinados de Graçinha, pelas reuniões maravilhosas e revigorantes, tudo é mais fácil quando vocês estão por perto.

Aos professores e amigos da Entomologia, da Biologia Celular e a todos do Laboratório de Ultraestrutura de Insetos, pelos momentos de aprendizado dentro e fora das salas de aula e pela amizade.

Aos meus pais, Carlos Alves Martins e Maria de Lourdes Barbosa Martins, minha base, meu sustento, meu alento, meu tudo.

Aos meus irmãos, Carmem, Ana Eulália, Norma, Jorge, Maria Zoraide, Luciana, Cícero e todos os meus sobrinhos, sempre torcendo por mim e dispostos a ajudar e me fazer feliz.

Ao meu esposo, Alex Sandro Aires da Cunha, pelo amor, dedicação e confiança a mim dedicados, além de todo apoio durante a realização de toda a pesquisa.

A todos que participaram dos bons e difíceis momentos que tive nessa jornada.

## BIOGRAFIA

Luiza Carla Barbosa Martins, filha de Carlos Alves Martins e Maria de Lourdes Barbosa Martins, nasceu em Itabuna, Bahia, em 13 de outubro de 1976.

Em 2004, graduou-se em Ciências Biológicas, Bacharelado com ênfase em Ecologia pela Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, Ilhéus, Bahia, Brasil.

Em março de 2007, iniciou o Curso de Mestrado em Entomologia pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, com bolsa da Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG, defendendo dissertação intitulada “Morfologia e Histoquímica de glândulas Intramandibulares em espécies representantes de Attini e Ponerini (Hymenoptera, Formicidae)”. em 19 de dezembro de 2008.

Em setembro de 2008, foi selecionada para o Curso de Doutorado em Entomologia pela Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais, Brasil.

Em março de 2009 iniciou no curso de Doutorado em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, com bolsa da FAPEMIG.

Em 2010, iniciou sua participação no projeto de pesquisa “Rede multidisciplinar de estudos sobre formigas Poneromorfas do Brasil” financiado pelo CNPq e SECTI/FAPESB-CNPq-PNX0011/2009, juntamente ao Laboratório de Mirmecologia do Centro de Pesquisas do Cacau – CEPLAC.

Em fevereiro de 2012, completa o que é exigido para a obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8
CAPÍTULO 1 - DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DAS GLÂNDULAS INTRAMANDIBULARES EM OPERÁRIAS DE <i>Pachycondyla verенаe</i> (FOREL 1922) (FORMICIDAE: PONERINI).	11
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1.INTRODUÇÃO.....	13
2.MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.RESULTADOS.....	15
4.DISSCUSSÃO.....	19
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
CAPÍTULO 2 - GLÂNDULAS INTRAMANDIBULARES NAS DIFERENTES CASTAS DA FORMIGA CORTADEIRA, <i>Atta</i> <i>laevigata</i> (FR. SMITH, 1858) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE, ATTINI).	34
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	36
1.INTRODUÇÃO.....	38
2.MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.RESULTADOS.....	43
4.DISSCUSSÃO.....	45

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
CAPÍTULO 3 - HIDROCARBONETOS E ESTERÓIS DAS GLÂNDULAS INTRAMANDIBULARES DE <i>Pachycondyla villosa</i> (FABRICIUS, 1804) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE, PONERINAE) E RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS.	65
RESUMO.....	65
ABSTRACT.....	67
1.INTRODUÇÃO.....	69
2.MATERIAL E MÉTODOS.....	72
3.RESULTADOS.....	76
4.DISSCUSSÃO.....	77
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
CONCLUSÕES FINAIS.....	94

## RESUMO

MARTINS, Luiza Carla Barbosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Glândulas intramandibulares de Formicidae (Ponerinae, Myrmicinae): desenvolvimento e seus componentes químicos.** Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadores: Eraldo Rodrigues de Lima e José Cola Zanuncio.

As formigas são especialmente ricas em glândulas exócrinas que variam na sua natureza estrutural, química e complexidade funcional, e esta riqueza em glândulas exócrinas talvez seja o grande ponto de seu sucesso biológico. Este estudo focalizou as glândulas intramandibulares de formigas “primitivas” Ponerini (Ponerinae) e derivadas Attini (Myrmicinae) quanto ao desenvolvimento de formas imaturas, diferenciação entre castas e componentes químicos, contribuindo para a compreensão dos mecanismos envolvidos na comunicação das formigas na tentativa de entender a possível função da glândula intramandibular que ainda permanece desconhecida. O estudo do desenvolvimento pós-embrionário das glândulas intramandibulares foi realizado em *Pachycondyla verенаe*, enquanto o estudo com a formiga cortadeira *Atta laevigata* investigou a ocorrência de glândulas intramandibulares nas castas de rainhas, operárias e soldados. Também foi realizado, o estudo dos componentes químicos presentes no interior da mandíbula e no corpo de operárias e rainhas de *Pachycondyla villosa*. Foram encontradas células epidérmicas secretoras da classe I, glândulas unicelulares da classe III e células epiteliais secretoras com reservatório. As células epidérmicas secretoras da classe I e glândulas unicelulares da classe III, encontradas em *P. verенаe*, diferenciam-se durante a pupação, iniciando seu desenvolvimento na pupa de olho rosa e estão completamente formadas a partir da pupa de olho preto. Diferente da classe glandular que foi encontrada em espécies de *Pachycondyla*, as glândulas intramandibulares em *A. laevigata* não apresentaram células epidérmicas secretoras da classe I, mas apresentaram glândulas unicelulares da classe III e células epidérmicas secretoras com reservatório. Os estudos morfológicos, histoquímicos e morfométricos das glândulas intramandibulares em *A. laevigata* suportam a hipótese de que essas glândulas estejam envolvidas diretamente na divisão de trabalho entre as

castas e, conseqüentemente, na comunicação química. As evidências comportamentais indicam que as substâncias químicas das glândulas intramandibulares de *P. villosa* estão envolvidas no reconhecimento de companheiras de ninho, e a presença de hidrocarbonetos e os esteróis colesterol em operárias e o sitosterol encontrado na mandíbula de rainhas podem estar associados ao perfil da casta, sendo provável que o sitosterol assuma o papel de um sinalizador de fertilidade e/ou uma possível fonte de hormônio. O conhecimento da ontogenia, morfo-fisiologia e composição química das glândulas intramandibulares das formigas pode contribuir para a elucidação dos mecanismos que envolvem o sistema exócrino e suas relações com os aspectos comportamentais e filogenéticos nas diferentes subfamílias de Formicidae. Com isso, é possível inferir que as glândulas intramandibulares das diferentes tribos e castas produzem substâncias de naturezas distintas, indicando funções diversas, dependendo da natureza química de constituintes celulares.

## ABSTRACT

MARTINS, Luiza Carla Barbosa. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Intramandibular glands in Formicidae (Ponerinae, Myrmicinae): development and chemical components.** Adviser: José Eduardo Serrão. Co-Advisers: Eraldo Rodrigues de Lima and José Cola Zanuncio.

In ants there are several exocrine glands that vary in their structure, chemical and functional aspects, and the abundance of exocrine glands may be an important point of their biological success. This work investigated intramandibular glands of "primitive" ants included in the Tribe Ponerini (Ponerinae) and derived Attini (Myrmicinae) including their development in immature, differentiation between caste and identification of chemical components, contributing to understand the mechanisms involved in the communication of ants as well as to elucidate the function of the intramandibular glands that is still unknown. The study of the post-embryonic development of the intramandibular glands was performed in *Pachycondyla verенаe*, while the study on the leaf-cutter ant *Atta laevigata* investigated the occurrence of intramandibular glands in the castes of queen, worker and soldier. The study of the chemical components present in the mandible and body occurred in *Pachycondyla villosa*. Ants in the study, epidermal secretory cells were found in class I, unicellular glands in class III and epithelial cells with secretory reservoir. The epidermal cells secretory of class I and unicellular glands of class III were found in *P.verенаe*. These glands differentiate during pupation, and their development begins in pink-eyed pupa and is complete in black-eyed pupae. Unlike the gland class that was found in *Pachycondyla*, the intramandibular glands in *A. laevigata*, did have in epidermal secretory cells of class I, but had unicellular glands of class III and epidermal cells secretory with reservoir. The morphological, histochemical and morphometric study of the intramandibular glands in *A. laevigata* supported the hypothesis that these glands are involved directly in the division of labor between castes, and consequently in their chemical communication. The behavioral analyses indicate that chemicals substances

from the intramandibular glands of *P. villosa* are involved in the recognition of nestmates, and the presence of hydrocarbons and cholesterol and the sitosterol found in the mandible of queen may be associated with the profile of caste, likely to be the sitosterol plays role as a flag of fertility and/or a possible source of the hormone. The knowledge of ontogeny, morphology, physiology and chemical composition of the intramandibular glands of ants can contribute to the elucidation of the mechanisms that involve the exocrine system and its relationship with the behavioral aspects and phylogenetic in different subfamilies of Formicidae. It is possible to infer that the intramandibular glands of different tribes and caste produce substances of different natures, indicating different functions, depending on the chemical nature of cellular components.

## INTRODUÇÃO GERAL

Os insetos sociais são caracterizados como organismos que apresentam as seguintes características comportamentais: *i*) indivíduos da mesma espécie que cooperam com o cuidado da cria; *ii*) as fêmeas estéreis trabalham para uma fêmea reprodutiva; e *iii*) sobreposição de, no mínimo, duas gerações em estágios de vida capazes de contribuir com a divisão de trabalho na colônia (Wilson, 1971; Hölldobler & Wilson, 1990). Dentre os insetos, aqueles definidos como sociais incluem representantes de cupins, formigas, vespas e abelhas (Wilson, 1971).

A vida em sociedade facilita a sobrevivência dos insetos, pois torna mais fácil a busca de alimento, aumenta as oportunidades de defesa contra os predadores e, inclusive, pode facilitar o cuidado com a prole e a construção de abrigos (Hölldobler & Wilson, 1990).

A comunicação recíproca de natureza cooperativa é um critério essencial para a manutenção da integridade das sociedades de insetos (Wilson, 1971). Para tanto, são utilizados mecanismos que envolvem compostos químicos denominados semioquímicos e receptores olfativos distribuídos pelos apêndices, especialmente nas antenas (Atkins, 1980). Os semioquímicos, diferentes dos hormônios que atuam no indivíduo que o produziu, atuam em indivíduos que estão à sua volta e são classificados em feromônios, compostos químicos produzidos por glândulas especializadas e secretados para fora do corpo do animal com efeito específico em outro indivíduo da mesma espécie; e aleloquímicos que atuam em indivíduos de espécies diferentes (Vilela e Della Lucia, 2001; Nation, 2002).

Uma das características comuns nos insetos sociais é a diversidade de glândulas exócrinas distribuídas por todo o corpo. O alto número e diversidade dessas glândulas acompanham as várias funções que suas secreções desempenham na vida desses insetos (Hölldobler & Wilson, 1990; Noirot & Quennedey, 1991; Billen & Morgan, 1998). Até o presente, esta variedade de glândulas chega a um total de 105 glândulas exócrinas que podem ser distinguidas entre os vários grupos de insetos sociais (Billen, 2008). Algumas glândulas estão presentes em todos os grupos de Hymenoptera, enquanto outras têm ocorrência restrita e podem ser encontradas apenas em uma única espécie. A composição química da secreção e/ou da função de várias glândulas é bem documentada, enquanto em outras glândulas, por exemplo, intramandibulares, há apenas descrição morfológica (Billen, 2008).

As glândulas exócrinas tegumentares dos insetos podem ser incluídas em três classes (Figura 1). A classe I é caracterizada por células da epiderme, que se tornam secretoras, sendo sua secreção liberada para o exterior do corpo por difusão através da cutícula. As glândulas da classe II são representadas por células cuja secreção também é eliminada para o exterior do corpo, passando através da cutícula, mas, neste caso, como a célula glandular não está em contato com a cutícula, a secreção passa antes para uma célula epidérmica. As células glandulares das classes I e II não possuem estruturas diferenciadas para a liberação da secreção, embora a quantidade de canais-poro da cutícula possa estar mais elevada na região do corpo onde ocorrem. Nas glândulas da classe III, as células secretoras geralmente não se encontram incorporadas à epiderme, embora sejam

originadas dela. A célula secretora destacada da epiderme é geralmente esférica e provida de um canal que a liga a um poro na cutícula, onde a secreção é descarregada (Noirot & Quennedey, 1974; 1991). As células secretoras das glândulas da classe III apresentam mecanismo complexo de liberação de secreção. A membrana plasmática invagina-se criando um espaço extracelular onde a célula canal se associa e realiza a coleta da substância produzida, conduzindo-a para o exterior. Esse espaço, na maioria das vezes, apresenta-se como um canalículo que, aparentemente, percorre o citoplasma da célula e tem sido denominado canalículo intracelular, embora topologicamente esteja fora da célula (Noirot & Quennedey, 1991; Cruz-Landim & Abdalla, 2002).

Além dessas três classes de glândulas, em *Attini* ocorrem células epidérmicas secretoras com reservatório (Figura 2), formadas pela hipertrofia das células epidérmicas contendo um amplo reservatório em regiões específicas da mandíbula (Amaral & Caetano, 2006; Billen, 2009; Martins & Serrão, 2011).

As formigas são especialmente ricas em glândulas exócrinas que variam na sua natureza estrutural, química e complexidade funcional (Billen & Morgan 1998; Caetano et al., 2002), e esta riqueza em glândulas exócrinas contribui para o sucesso destes insetos (Caetano, 2007).

Nos Hymenoptera em geral, encontram-se dois tipos de glândulas mandibulares, as ectomandibulares ou glândulas mandibulares I e as mesomandibulares, intramandibulares ou glândulas mandibulares II (Figura 3). As glândulas ectomandibulares são as mais estudadas, portanto quase sempre é a elas que se refere o conhecimento sob a rubrica de “glândulas

mandibulares”, distinguindo-as das intramandibulares (Cruz-Landim & Abdalla, 2002).

As glândulas intramandibulares enquadram-se na categoria de glândulas tegumentares e diferenciam-se também durante a pupação, juntamente com a diferenciação do tegumento das mandíbulas (Cruz-Landim & Abdalla, 2002). Em formigas, até o momento, não se sabe em qual período da fase pupal inicia-se sua formação.

Estudos mais aprofundados das glândulas intramandibulares devem ser conduzidos para se determinar as funções destas glândulas (Schoeters & Billen, 1994; Ribeiro & Caetano, 2000; Billen & Espadaler, 2002; Amaral & Caetano, 2006). Martins & Serrão (2011), diante de características morfológicas e histoquímicas sugerem que as glândulas intramandibulares de Attini e Ponerini produzem substâncias químicas de natureza distinta e a ocorrência de tais glândulas varia de acordo com a tribo.

Attini e Ponerini têm sido considerados grupos derivados e presumidamente similares ao ancestral, respectivamente (Wheeler, 1910; Kusnezov, 1955; Taylor, 1978).

Assim, a característica marcante que separa ambos os grupos está, entre outras, na existência de castas morfológicamente distintas em Attini, que não ocorrem em Ponerini, o que pode resultar em diferentes estratégias de comunicação intra-específica importantes para exploração de recursos tróficos (Fowler et al., 1991). Com isso, é importante estudar as glândulas que podem participar da produção de semioquímicos para compreensão do comportamento de Attini e Ponerini.

Comportamentos que requerem dispersão rápida dos sinais químicos, como os de alarme podem envolver feromônios constituídos por moléculas pequenas e voláteis, embora os insetos sociais apresentem vários outros mecanismos de comunicação nos quais estão envolvidos compostos não voláteis (Howard & Blomquist, 2005; Blomquist & Bagnères, 2010).

Embora tardiamente, o comportamento tem sido acoplado aos estudos morfológicos e fisiológicos dos animais, pois, muitas respostas a esses comportamentos exibidos por alguns animais, em especial de formigas, foram dadas graças a conhecimentos gerados por estudos anatomo-fisiológicos. Assim sendo, os estudos de anatomia interna de insetos e, claro, os de formigas, são frutos de inter-relações entre as informações obtidas nessas três áreas das Ciências Biológicas (Caetano, 2007).

Os conhecimentos sobre as características dos compostos químicos, em especial hidrocarbonetos cuticulares envolvidos na comunicação das formigas, vêm crescendo nos últimos anos graças às descobertas de novas técnicas de extração e análises químicas que, juntamente com o estudo morfológicos e de comportamento, vem fornecendo subsídios para o entendimento dos aspectos sociobiológicos desses insetos.

Este trabalho teve por objetivo estudar as glândulas intramandibulares de formigas quanto ao desenvolvimento em imaturos, a diferenciação entre castas e componentes químicos, contribuindo para a compreensão dos mecanismos envolvidos na comunicação das formigas bem como para se inferir uma possível função da glândula intramandibular que ainda permanece desconhecida.

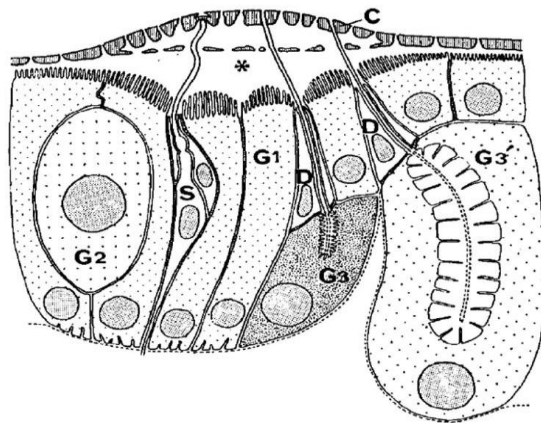


Figura 1. Esquema de três principais classes de glândulas tegumentares em insetos (Noirot & Quennedey, 1974). (G1) glândulas da classe I, caracterizadas por células epidérmicas que se tornam cúbicas ou colunares, sem reservatório. (G2) glândulas da classe II, a célula glandular não está em contato com a cutícula, a secreção passa antes para uma célula epidérmica. (G3 e G3') glândulas unicelulares da classe III, formadas por células isoladas na cavidade interna da mandíbula, caracterizadas pela presença de canalículos que se abrem em poros na superfície da mandíbula. (D) ductos celular. (S) sensilas campaniformes. (C) cutícula.

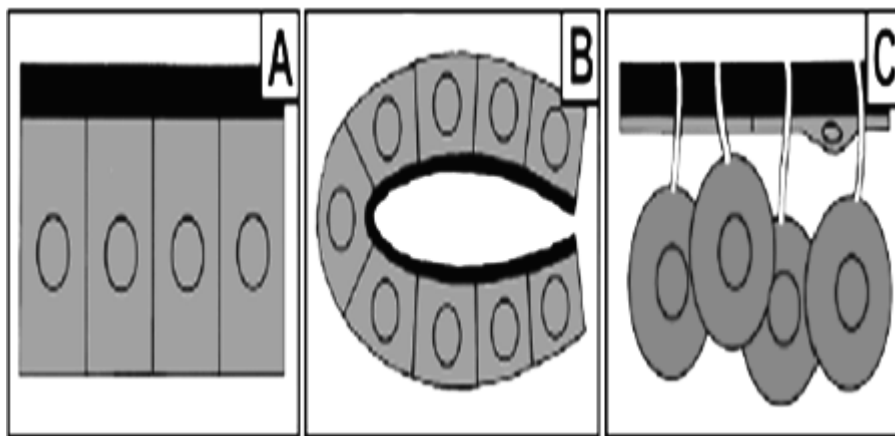


Figura 2. Adaptação do esquema de glândulas encontradas em Fomicidae (Billen, 2009). (A) glândulas epiteliais da classe I, sem reservatório. (B) glândulas epiteliais, com reservatório. (C) glândulas bicelulares da classe III.

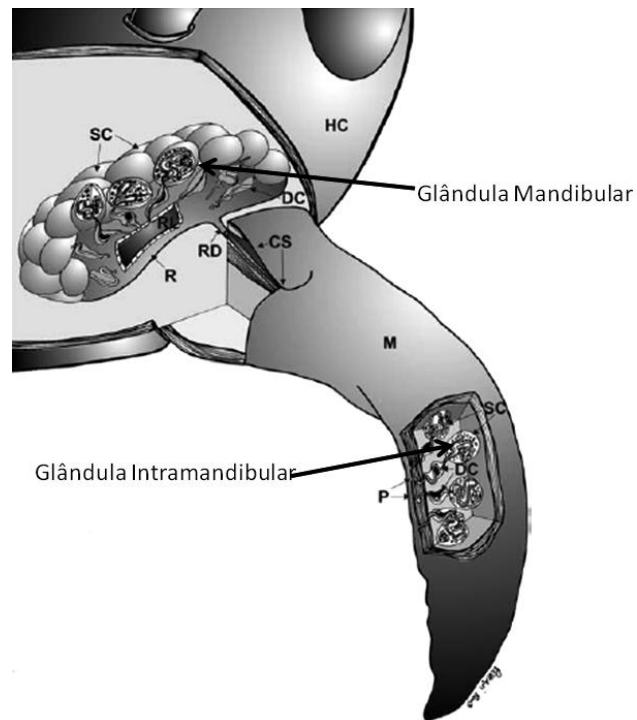


Figura 3. Adaptação do esquema de Grasso et. al. (2004). Glândulas mandibulares e intramandibulares, mostrando a posição da glândula mandibular dentro da cápsula cefálica e seu local de liberação. O corte de parte da mandíbula mostra a posição das glândulas intramandibulares. CS, fenda cuticular; DC, células dos ductos; HC, cápsula cefálica; M, mandíbula; P, Poros. R, reservatório; RD, reservatório de conduta; RL, reservatório do lúmem; SC, células secretoras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, J.B. & CAETANO, F.H. The intramandibular gland of leaf-cutting ants (*Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908). **Micron**. 37:154-160. 2006.
- ATKINS, M.D. **Introduction to insect behaviour**. Macmillan Publication 10. Inc., New York. 237 p. 1980.
- BILLEN J. Occurrence and structural organization of the exocrine glands in the legs of ants. **Arthropod Structure & Development**. 38: 2–15. 2009.
- BILLEN, J. & ESPADALER, X. A novel epithelial intramandibular gland in the ant *Pyramica membranifera* (Hymenoptera, Formicidae). **Belgian Journal of Zoology**. 132: 175-176. 2002.
- BILLEN, J. & MORGAN, E.D. Pheromone communication in social insects – sources and secretions. In: MEER, V., R.K, BREED, M.D, ESPELIE, K.E, WINSTON, M.L (eds) **Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites**. Westview, Boulder, Colorado, pp 3-33. 1998.
- BILLEN, J. A importância das glândulas exócrinas na sociedade de insetos. In: VILELA, E. *et al.* (eds.). **Insetos sociais: da biologia à aplicação**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 442p. 2008.
- BLOMQUIST G.J. & BAGNÈRES A.G. **Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology**. Cambridge: Cambridge University Press. 528 p. 2010.
- CAETANO, F.H. O estado da arte da morfologia interna de formigas. **O Biológico**. 69:189-193. 2007.

- CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K. & ZARA, F.J. **Formigas: biologia e anatomia.**  
Rio Claro: F.H.C., 42p. 2002.
- CRUZ-LANDIM, C. & ABDALLA, F.C. **Glândulas exócrinas das abelhas.**  
Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 181p. 2002.
- FOWLER, H.G.; FORTI, L.C.; BRANDÃO, C.R.F.; DELABIE, J.H.C. &  
VASCONCELOS, H.L. Ecologia nutricional de formigas. In: PANIZZI,  
A.R.; PARRA, J.R.P. (ed.). **Ecologia nutricional de insetos e suas  
implicações no manejo de pragas.** São Paulo: Editora Manole.  
pp.131-209. 1991.
- HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E.O. **The ants.** Cambridge, Belknap/Harvard  
University Press. 732p. 1990.
- HOWARD, R.W. & BLOMQUIST, G.J. Ecological, behavioural, and  
biochemical aspects of insect hydrocarbons. **Annual Review of  
Entomology.** 50:371-393. 2005.
- KUSNEZOV, N. Evolución de las hormigas. **Dusenía.** 6:1-34. 1955.
- MARTINS, L.C.B. & SERRÃO, J.E. Morphology and histochemistry of the  
intramandibular glands in Attini and Ponerini (Hymenoptera,  
Formicidae) species. **Microscopy Research and Technique.** 74:763-  
771. 2011.
- NATION, J.L. **Insect Physiology and Biochemistry.** Boca Raton: CRC  
Press LLC. 485p. 2002.
- NOIROT, C. & QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal  
glands. **Annual Review of Entomology.** 19:61-80. 1974.

- NOIROT, C. & QUENNEDEY, A. Glands, gland cells, glandular units: Some comments on terminology and classification. **Annales de la Société Entomologique de France**. 27:123-128. 1991.
- RIBEIRO, M. & CAETANO, F.H. **Cytochemistry for visualization of the Golgi complex in the in the intramandibular gland of old major workers of *Zacryptocerus pusillus* (Hymenoptera, Formicidae)**. ICEM 14 Cancum. pp.749-750. 2000.
- SCHOETERS, E. & BILLEN, J. The intramandibular gland, a novel exocrine structure in ants (Insecta, Hymenoptera). **Zoomorphology**. 114:125-131. 1994.
- TAYLOR, R.W. *Nothomyrmecia macrops*: a living-fossil ant rediscovered. **Science**. 201: 979-985. 1978.
- VILELA, E.F. & DELLA LUCIA, T.M.C. Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas. Viçosa: UFV. 206 p. 2001.
- WHEELER, W.M. **Ants: their structure, development and behavior**. Columbia University Press, New York. 663 p. 1910.
- WILSON, E.O. **The insect societies**. Cambridge, MA. Harvard Univ.Press. 548 p.1971.

## CAPÍTULO 1

### DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DAS GLÂNDULAS INTRAMANDIBULARES EM OPERÁRIAS DE *Pachycondyla verenae* (FOREL 1922) (FORMICIDAE: PONERINI).

#### RESUMO

O conhecimento atual das glândulas intramandibulares em Hymenoptera resume-se a relatos sobre sua ocorrência e características morfo-fisiológicas em indivíduos adultos, sendo este o primeiro relato sobre o desenvolvimento pós-embrionário das glândulas intramandibulares em *Pachycondyla verenae*, espécie que presumivelmente, possui características similar ao ancestral e não apresentam dimorfismo entre as castas operárias. Mandíbulas de formigas nas fases de pré-pupa, pupa de olho branco, pupa de olho rosa, pupa de olho preto, pupa de corpo pigmentado e adultas foram submetidas a análises histológicas e histoquímicas. Operárias adultas de *P. verenae* apresenta glândulas intramandibulares caracterizadas por células epidérmicas secretoras da classe I e glândulas unicelulares da classe III, sendo que essas glândulas diferenciaram-se durante a pupação, a partir de pupas de olho rosa. Os resultados histoquímicos foram positivos para evidenciação de carboidratos e para proteínas, e negativo na evidenciação de lipídios a partir da pupa de olho branco. Os resultados deste estudo das glândulas intramandibulares em operárias de *P. verenae* indicam que as células epidérmicas secretoras da classe I e glândulas unicelulares da classe III diferenciam-se durante a pupação, iniciando seu desenvolvimento na pupa de olho rosa e estão completamente desenvolvidas a partir da pupa de olho preto.

**POST-EMBRYONIC DEVELOPMENT OF INTRAMANDIBULAR  
GLANDS IN WORKERS OF *Pachycondyla verenae* (FOREL 1922)  
(FORMICIDAE: PONERINI).**

**ABSTRACT**

The current knowledge of intramandibular glands in Hymenoptera, summarizes their occurrence, morphological and physiological characteristics in adults, and this is the first report on the post-embryonic development of these intramandibular glands in *Pachycondyla verenae*, a species that has presumably similar to the ancestral characteristics and do not show dimorphism between castes workers. Mandibles of ants in the pre-pupae, white-eyed, pink- eyed pupae, black-eyed pupae, pupa of pigmented body and adult caste workers were subjected to histological and histochemical analyzes. Adult workers of *P. verenae* have intramandibular glands with epidermal secretory cells of class I and unicellular glands of class III, and these glands arose during pupation, in pink-eye pupae. The histochemical results were positive for disclosure of carbohydrates and proteins and lipids in the disclosure of negative from the white-eyed pupae. The results of the study of intramandibular glands in workers of *P. verenae* indicate that the epidermal secretory cells of class I and unicellular glands of class III differentiate during pupation and it starts from pink- eyed pupa and are fully developed in the black-eyed pupae.

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento é uma etapa da ontogenia de um indivíduo, caracterizado como processo de evolução e transformações biológicas sofridas, desde a sua geração até seu total desenvolvimento (Gullan & Cranston, 2008). Igualmente importantes são as mudanças, tanto sutis quanto drásticas, que acontecem na forma do corpo conforme os insetos sofrem mudas e crescem. As mudanças nas formas durante a ontogenia afetam tanto as estruturas externas quanto os órgãos internos, mas apenas as mudanças externas são aparentes em cada muda (Gullan & Cranston, 2008).

Nos Hymenoptera, as glândulas estão presentes nos adultos de todas as espécies (Cruz-Landim & Abdalla, 2002). Até o presente, um total de 105 glândulas exócrinas podem ser distinguidas entre os vários grupos de insetos sociais (Billen, 2008). O alto número e diversidade dessas glândulas acompanham as várias funções que suas secreções desempenham na vida dos insetos sociais (Hölldobler & Wilson, 1990; Noirot & Quennedey, 1991; Billen & Morgan, 1998).

O conhecimento atual das glândulas intramandibulares em indivíduos adultos de Hymenoptera resume-se a relatos sobre sua ocorrência e características morfo-fisiológicas em abelhas (Nedel, 1960; Toledo, 1967; Costa-Leonardo, 1978; Cruz-Landim & Abdalla, 2002; Santos, et al. 2009; Cruz-Landim et al., 2011) e formigas (Schoeters & Billen, 1994; Ribeiro & Caetano, 2000; Billen & Espadaler, 2002; Grasso et al., 2004; Roux et al., 2010; Martins & Serrão, 2011). A situação fica ainda mais obscura quanto se trata do desenvolvimento pós-embrionário da glândula intramandibular. Nas

abelhas, as glândulas intramandibulares diferenciam-se durante a pupação, juntamente com a diferenciação do tegumento das mandíbulas (Cruz-Landim & Abdalla, 2002).

Em Hymenoptera, estudos sobre o desenvolvimento das glândulas estão restritos a algumas poucas glândulas que não as intramandibulares, tais como, glândulas pós-faríngeas e hipofaríngeas (Gama, 1978), glândula de Dufour (Abdalla et al., 1999; Billen et al., 2001), glândula mandibular (Gama, 1978; Cruz-Landim & Abdalla, 2002) e glândula labial ou salivar (Gama, 1978; Lommelen, et al., 2003). Portanto, poucos são os estudos sobre o desenvolvimento das diferentes glândulas distribuídas no corpo das formigas, especialmente, no que se refere às glândulas intramandibulares, exceto por dados sobre sua morfologia em adultos. Este é, o primeiro relato sobre o desenvolvimento pós-embrionário das glândulas intramandibulares em Ponerini, grupo que possui características presumivelmente similares ao ancestral (Kusnezov, 1955; Peeters & Crewe, 1984) e não apresentam dimorfismo entre as castas operárias como encontrado em Attini (Hölldobler & Wilson, 1990).

Considerando o exposto, este trabalho teve por objetivo descrever a morfologia das glândulas intramandibulares de *Pachycondyla verenae* durante o estágio pupal para verificar em qual fase do ciclo de vida da formiga, essas glândulas se diferenciam, contribuindo para compreensão de sua estrutura e função em Ponerini.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Cinco colônias de *P. verenae* foram coletadas no campo de fruticultura da Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais – Brasil. Operárias em diferentes fases do desenvolvimento foram utilizadas sendo classificadas em pré-pupa, pupa de olho branco, pupa de olho rosa, pupa de olho preto, pupa com corpo pigmentado e adulta (Figuras 1 e 2). De cada uma das fases do desenvolvimento, três a cinco indivíduos foram crio-anestesiados e as mandíbulas retiradas e transferidas para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967). A seguir, as mandíbulas foram desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e embebidas em historesina Leica. Após a polimerização, as peças foram seccionadas longitudinalmente, com 3 µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina.

Algumas secções histológicas das mandíbulas obtidas para as análises histológicas foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos: Mercúrio-bromofenol para evidenciação de proteínas, PAS (Ácido Periódico-Schiff) para evidenciação de polissacarídeos e glico-conjugados, e azul do Nilo para identificação de lipídios, segundo Pearse (1985) e Bancroft & Gamble (2007).

## **3. RESULTADOS**

Para se determinar a morfologia das glândulas intramandibulares estas foram caracterizadas primeiramente nas operárias adultas, seguindo-se o acompanhamento do desenvolvimento a partir da pré-pupa.

## **Adulto**

Nas operárias adultas de *P. verenae* foram encontradas glândulas da classe I, caracterizadas como células epidérmicas colunares (Figura 3) e glândulas unicelulares da classe III (Figura 4) isoladas na cavidade da mandíbula, que se mostram esféricas contendo um canalículo que se abre em poros na superfície da mandíbula.

As células epidérmicas secretoras da classe I têm núcleo bem desenvolvido e esférico e citoplasma acidófilo com aspecto homogêneo (Figura 3), enquanto as glândulas da classe III são caracterizadas por células esféricas com o citoplasma apresentando intensa vacuolização e núcleo bem desenvolvido (Figura 4). Os núcleos das células secretoras das classes I e III apresentaram cromatina predominantemente descondensada.

Os testes histoquímicos em *P. verenae* foram positivos para carboidratos e lipídios para células secretoras da classe I e III, similarmente ao reportado por Martins & Serrão (2011) e, portanto, não serão aqui apresentados.

## **Pré-Pupa**

As secções histológicas das mandíbulas de pré-pupa não evidenciaram nenhuma estrutura celular na cavidade intramandibular, sendo encontrada apenas a epiderme formada por células achatadas (Figura 5).

## **Pupa de olho branco**

Em pupas de olho branco, o interior da mandíbula é caracterizado por uma intensa reorganização, com as células apresentando distribuição

irregular com aspecto de filamentos que se anastomosam, sendo os núcleos pequenos (Figura 6), bem como alguns aglomerados de células retangulares ricas em proteínas (Figura 7). As células epidérmicas formam uma camada única com aspecto cúbico embora algumas regiões da mandíbula sejam achatadas (Figuras 6 e 8). Além das células, o interior da mandíbula é caracterizado por material de aspecto floculento que reage positivamente ao PAS e para proteínas (Figuras 8 e 9). Não foi detectada a presença de lipídios.

### **Pupa de olho rosa**

Nas pupas de olho rosa, as células da epiderme mandibular são semelhantes às células epidérmicas secretoras da classe I descritas para os adultos, porém com algumas variações em forma e tamanho, pois algumas células são esféricas e outras colunares (Figuras 10 e 12). O epitélio apresenta diferenças numa mesma mandíbula; um lado com epitélio colunar e do outro semelhante a epitélio pseudo-estratificado (Figura 10), já sendo possível identificar neuroblastos precursores de neurônios (vai dá origem a uma sensila mecanossensível mais neurônio sensorial) que formarão a parte sensitiva de sensilas (Figura 11).

Na cavidade mandibular, as células precursoras da glândula da classe III estão dispersas, com citoplasma claro, o que torna difícil a identificação do limite celular (Figuras 12 e 13). Os núcleos das células apresentaram cromatina descondensada (Figuras 11 e 12). Além das células dispersas na cavidade da mandíbula, há ocorrência de corpos cromáticos que possuem

tamanho pequeno e se coram intensamente pela hematoxilina (Figuras 10 e 11).

A cutícula já está bem desenvolvida e evidente, apresentando a formação dos dentes da mandíbula (Figura 10).

Na região basal das células epidérmicas foi detectada a presença de carboidratos e proteínas (Figuras 14 e 15), enquanto o teste com azul do Nilo para evidenciar lipídio foi negativo.

### **Pupa de olho preto**

Em pupas de olho preto, a epiderme mandibular não possui mais características de epitélio pseudo-estratificado como encontrado na fase anterior, caracterizando-se agora como epitélio simples de células cúbicas (Figura 17), mostrando-se como células epidérmicas secretoras da classe I. Nessa fase, foram evidenciadas também glândulas unicelulares da classe III (Figura 16) que, até o presente, haviam sido encontradas na fase anterior, porém pouco definidas. Essa última classe de células glandulares é encontrada em menor quantidade quando comparada com aquelas dos adultos, contendo citoplasma homogêneo com ausência de vacúolos (Figuras 16). Corpos cromáticos e núcleos dispersos na hemocele são escassos nessa fase.

Os resultados histoquímicos foram positivos na evidenciação de carboidratos e proteínas nas células glandulares das classes I e III (Figuras 18 e 19), e negativos para presença de lipídio.

### **Pupa com corpo pigmentado**

Pupas com o corpo pigmentado apresentam a epiderme mandibular com células cúbicas e células glandulares da classe III com alguma vacuolização citoplasmática (Figura 20).

## **4. DISCUSSÃO**

As glândulas intramandibulares em operárias de *P. verenae* diferenciam-se durante a pupação conforme relatado em abelhas por Cruz-Landim & Abdalla (2002), apresentando células epidérmicas secretoras da classe I e glândulas unicelulares da classe III segundo classificação de Noirot & Quennedey (1974, 1991). Essas glândulas estão presentes a partir de pupas de olho rosa, não havendo qualquer vestígio destas glândulas na pré-pupa e na pupa de olho branco.

A ocorrência das glândulas intramandibulares em *P. verenae* apresentando células epidérmicas secretoras da classe I e glândulas unicelulares da classe III, corrobora estudos morfológicos sobre as glândulas intramandibulares da classe I e III em adultos de abelhas (Nedel, 1960; Toledo, 1967; Costa-Leonardo, 1978; Cruz-Landim & Abdalla, 2002; Santos, et al. 2009; Cruz-Landim et al., 2011) e formigas (Schoeters & Billen, 1994; Ribeiro & Caetano, 2000; Billen & Espadaler, 2002; Grasso et al., 2004; Roux et al., 2010; Martins & Serrão, 2011).

O processo de desenvolvimento das glândulas intramandibulares não foi evidenciado na fase de pré-pupa, provavelmente por essa ser uma fase semelhante à "fase de descanso" e por não apresentar transformações morfológicas da última fase larval como também não apresentam

característica de pupa. De acordo com Costa & Vanin (1985), pré-pupa é uma fase intermediária entre a larva do último instar e pupa, caracterizada por um breve período de repouso.

As pupas de olho branco também não apresentaram evidências da presença de glândulas intramandibulares, no entanto, apresentaram processos de reorganização celular, provavelmente por processos de proliferação e diferenciação das células epidérmicas, sugerindo ser essa, uma fase inicial do desenvolvimento das glândulas intramandibulares bem como da mandíbula como um todo, pois a mesma ainda não apresenta características morfológicas da mandíbula de adulto, como a presença dos dentes.

As glândulas intramandibulares caracterizadas como células epidérmicas secretoras da classe I e glândulas unicelulares da classe III evidenciadas na fase de pupa de olho rosa foram similares às encontradas por Gama (1978), que estudou o desenvolvimento das glândulas que compõem o sistema salivar (glândulas: labiais ou salivares propriamente ditas, pós-faríngeas, hipofaríngeas e mandibulares), concluindo que essas glândulas são originadas durante a metamorfose, ou seja, pós-embrionariamente. Entre as glândulas estudadas por Gama (1978), apenas as glândulas salivares do tórax são encontradas correspondentes na larva e têm desenvolvimento pós-embrionário.

Em pupas de corpo pigmentado, as células epidérmicas secretoras da classe I e glândulas unicelulares da classe III são bem diferenciadas e definidas, similarmente ao reportado para outras glândulas do sistema salivar de *Camponotus rufipes* que atingem sua máxima diferenciação na

pupa com corpo pigmentado, embora ainda não tenham iniciado sua atividade secretora (Gama, 1978). O mesmo pode estar ocorrendo nas glândulas intramandibulares de *P. verenae*, uma vez que a quantidade de glândulas em pupa com corpo pigmentado é reduzida em comparação ao inseto adulto.

As mudanças que ocorrem durante a metamorfose envolvem vários níveis de organização. Os processos celulares básicos que resultam na mudança de forma nos tecidos e órgãos são: 1) adição de novas células por divisão celular, ou perda de células por morte celular, as quais levam a mudanças da forma dos órgãos; 2) mudanças na forma das células; e 3) movimentos celulares (Cruz Landim, 2009). No presente estudo, foi observado grande parte desses processos, no entanto, somente a partir da fase de pupa de olho preto foi possível observar uma estabilidade nos processos celulares quanto as mudanças na organização celular, e nessa fase pode-se afirmar que as glândulas intramandibulares atingiram sua forma definitiva.

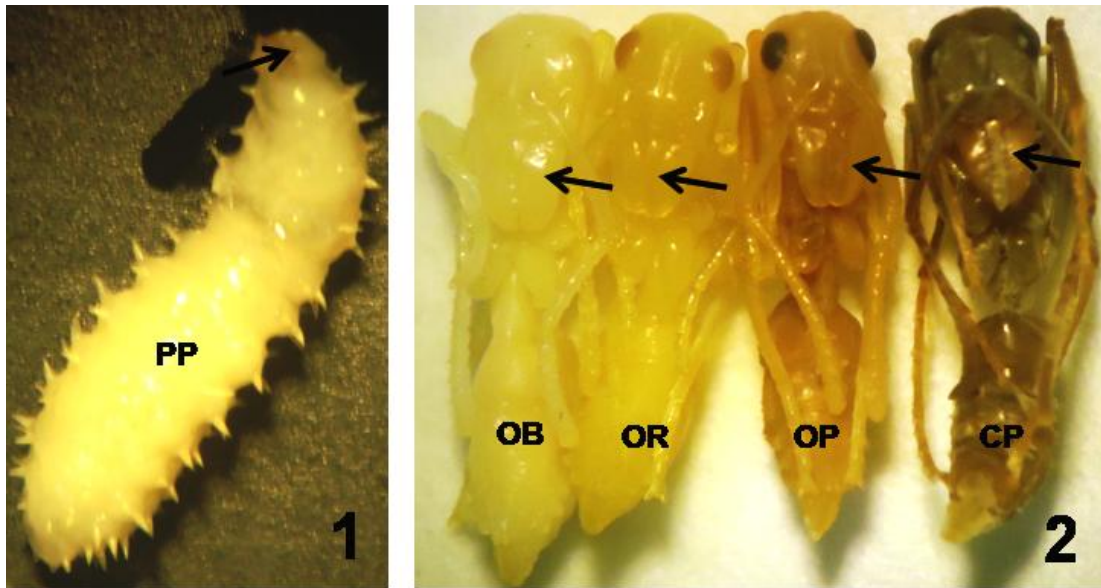
A positividade dos testes histoquímicos para proteínas e carboidratos a partir de pupas de olho branco sugere que nessas fases de desenvolvimento ocorre uma forte atividade celular, oriunda talvez da maquinaria metabólica das glândulas. Quennedey (1998) e Amaral & Caetano (2006) sugeriram que as células secretoras de classe III contêm carboidratos e proteínas, estando os compostos secretados relacionados com a produção de enzimas e glico-conjugados. Já os lipídios, desempenham funções-chave no organismo, tais como servir de fonte de energia, agir como hormônio e outras. Sendo assim, a ausência de lipídios nas células glandulares em todas as fases pupais,

provavelmente esteja ligada a inatividade mecânica, uma vez que no período pupal, as formigas ficam imóveis e não se alimentam.

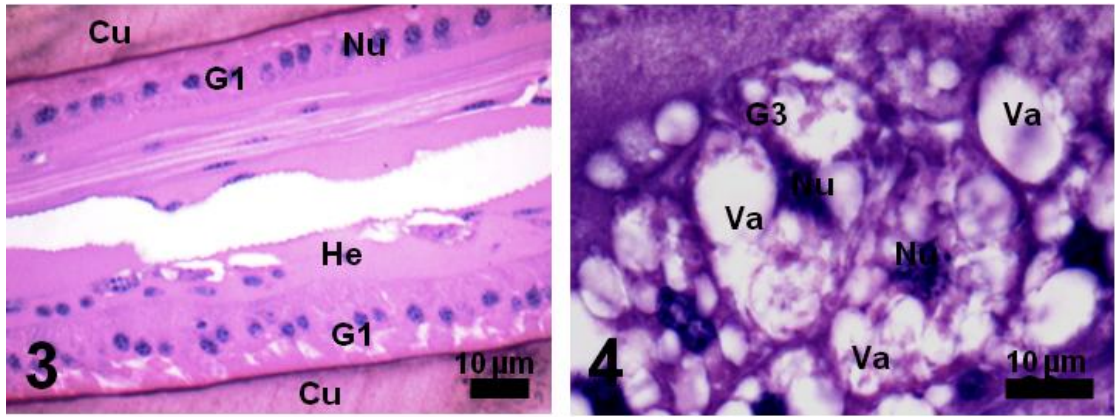
O estudo das glândulas intramandibulares em operárias de *P. verenae*, por meio de métodos histológicos e histoquímicos possibilitou concluir que as células epidérmicas secretoras da classe I e glândulas unicelulares da classe III, diferenciam-se durante a pupação, iniciando seu desenvolvimento na pupa de olho rosa e estão completamente formadas a partir da pupa de olho preto.

### **AGRADECIMENTOS**

A FAPEMIG pela concessão da bolsa, e pelo suporte das agências de pesquisas brasileiras CNPq e SECTI/FAPESB-CNPq-PNX0011/2009. A Dra. Ronara S. Ferreira da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil, pelo auxílio nas coletas e ao Setor de Fruticultura da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil, pela liberação da área para coleta.



Figuras 1 e 2: Fotografias das diferentes fases do desenvolvimento de operárias de *Pachycondyla verenae* utilizadas no estudo. Pré-pupa (PP), pupa de olho branco (OB), pupa de olho rosa (OR), pupa de olho preto (OP) e pupa de corpo pigmentado (CP). Setas: mandíbulas.



Figuras 3-4: Secções histológicas das mandíbulas em operárias adultas de *Pachycondyla verena*. 3: Células epidérmicas secretoras da classe I (G1), com a epiderme de células colunares. 4: Glândulas unicelulares da classe III (G3), muito vacuolizada (Va) e núcleos (N) com predomínio de cromatina descondensada. Cu: cutícula. He: hemocele.

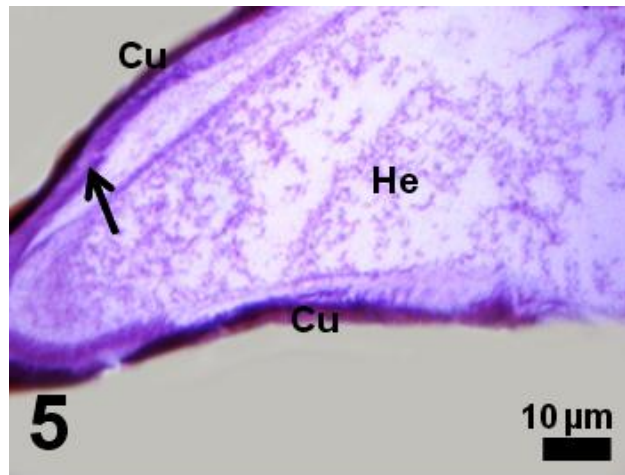
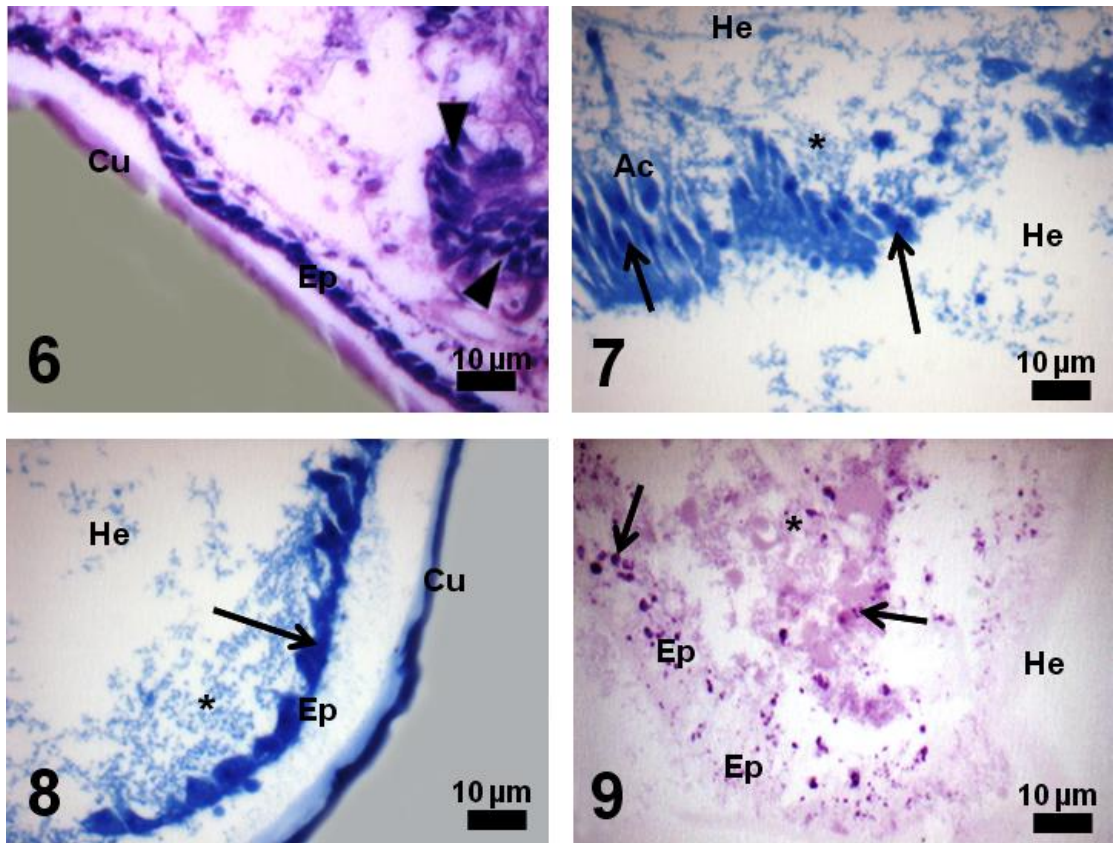
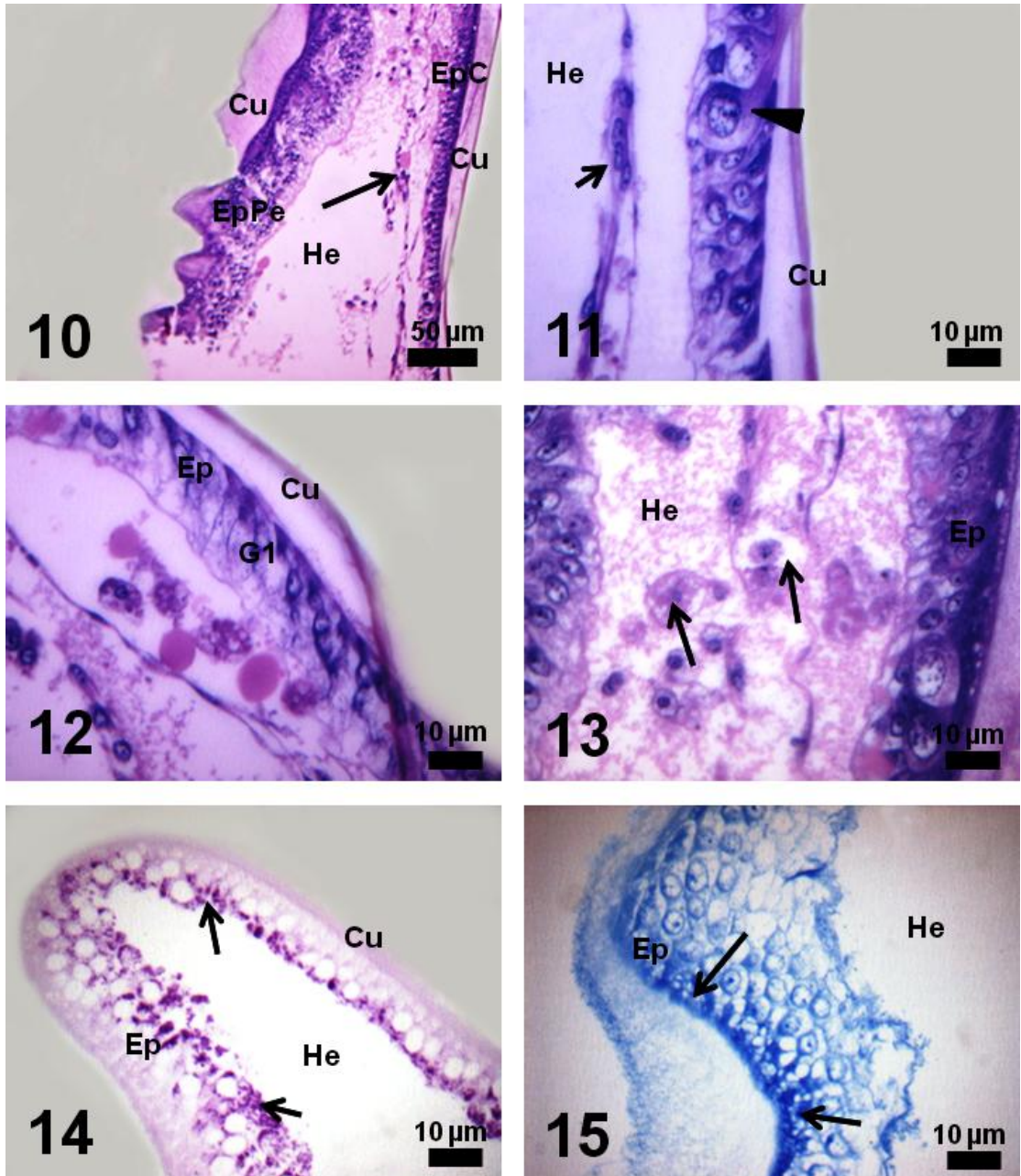


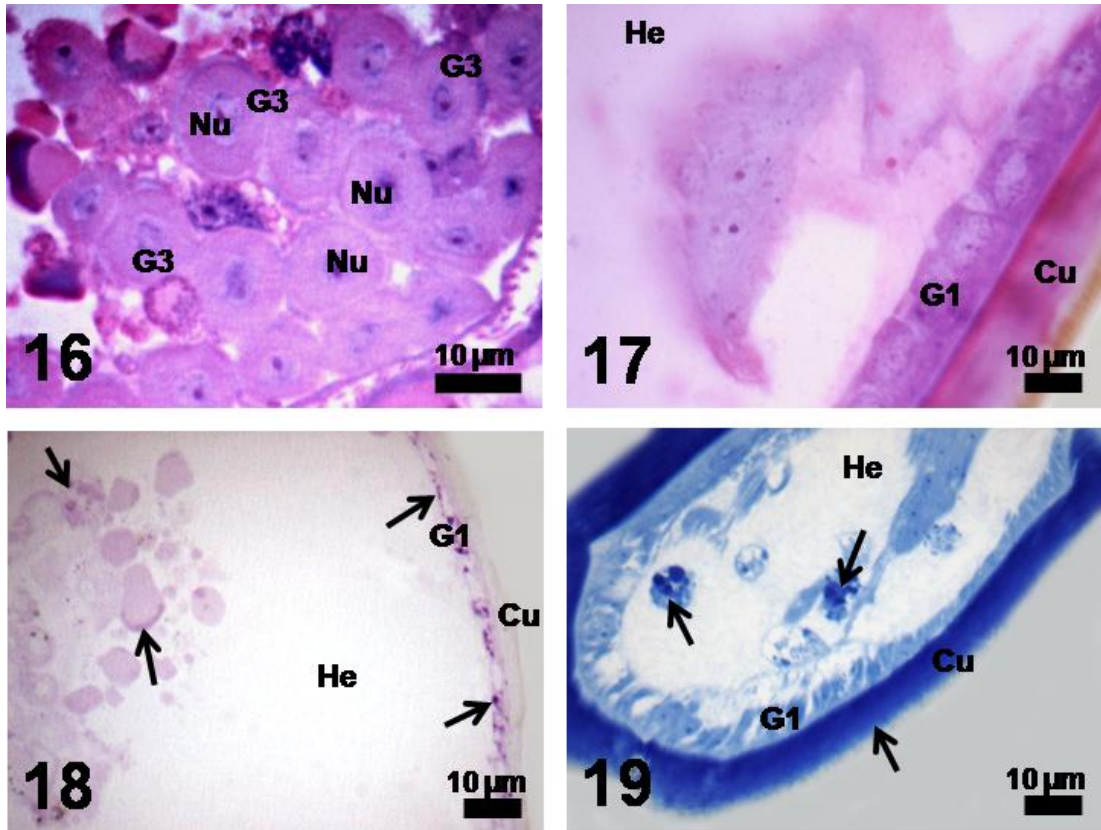
Figura 5: Secções histológicas das mandíbulas de pré-pupa de *Pachycondyla verenae*, mostrando epiderme achatada (seta). He: hemocele. Cu: cutícula.



Figuras 6-9: Secções histológicas das mandíbulas de *Pachycondyla verenae*. 6: Pupa de olho branco mostrando a epiderme (EP) com células achatadas, núcleos (pontas de setas) de células irregulares na cavidade da mandíbula. 7: Pupa de olho branco mostrando aglomerado celular (Ac) e material floculento (\*) na cavidade da mandíbula, positivos para proteínas (mercúrio-bromofenol) (seta). 8: Pupa de olho branco mostrando epiderme (Ep), com células cúbicas e material floculento (\*), reações positivas na epiderme para proteínas (mercúrio-bromofenol) (seta). 9: Pupa de olho branco mostrando material floculento (\*) e epiderme (Ep) positivos para carboidratos (PAS) (setas) He: hemocele. Cu: cutícula.



Figuras 10-15: Secções histológicas das mandíbulas em pupa de olho rosa (OR) de operárias de *Pachycondyla verenae*. 10: Epiderme colunar (Ep) e de aspecto pseudo-estratificado (EpPe) e presença corpos cromáticos (seta) na cavidade da mandíbula. 11: Neuroblastos (ponta de seta) na epiderme (Ep). Note corpos cromáticos (seta) na hemocele (He). 12 células epidérmicas colunares semelhantes a glândula da classe I (G1). 13: Células precursoras das glândulas da classe III (seta) com citoplasma claro na cavidade mandibular. 14: Reação positiva para carboidratos (PAS) (seta) na porção basal das células da classe I. 15: Reação positiva para proteínas (mercúrio-bromofenol) (seta) nas células da classe I. Cu: cutícula.



Figuras 16-19: Secções histológicas das mandíbulas em pupa de olho preto de operárias de *Pachycondyla verenae*. 16: Glândulas unicelulares da classe III (G3) mostrando núcleo (Nu) bem desenvolvido e citoplasma acidófilo de aspecto homogêneo. 17: Células glândulares da classe I (G1) mostrando núcleo com predomínio de cromatina descondensada. 18: Reação positiva para carboidratos (PAS) (setas) nas células glandulares das classes I (G1) e III (G3). 19: Reação positiva para proteínas (mercúrio-bromofenol) (setas) nas células glandulares das classes I (G1) e III (G3). Ep: epitélio. He: hemocela. Cu: cutícula. Nu: núcleo.

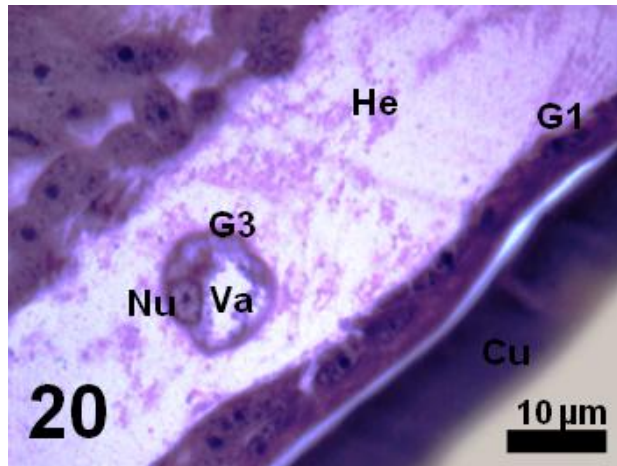


Figura 20: Sec o histológica das mandíbulas de pupa com corpo pigmentado de *Pachycondyla verenae* mostrando epiderme formada por células glandulares da classe I (G1) e glândula da classe III (G3) com citoplasma vacuolizado (Va). Ep: epitélio. He: hemocela. Cu: cutícula. Nu: núcleo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, F.C.; VELTHUIS, H.W.W.; CRUZ-LANDIM, C. & DUCHATEAU, M.J. Changes in the morphology and ultrastructure of the Dufour gland during the life cycle of the bumble bee queen, *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Bombini). **Netherlands Journal of Zoology**. 49:251-261. 1999.
- AMARAL, J.B. & CAETANO, F.H. The intramandibular gland of leaf-cutting ants (*Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908). **Micron**. 37:154-160. 2006.
- BANCROFT, J.D. & GAMBLE, M. **Theory and Practice of Histological Techniques**. Churchill Livingstone. 6ª edição. 744 p. 2007.
- BILLEN, J. & ESPADALER, X. A novel epithelial intramandibular gland in the ant *Pyramica membranifera* (Hymenoptera, Formicidae). **Belgian Journal of Zoology**. 132: 175-176. 2002.
- BILLEN, J. & MORGAN, E.D. Pheromone communication in social insects – sources and secretions. In: VANDER MEER, R.K, BREED, M.D, ESPELIE, K.E, WINSTON, M.L (EDS) **Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites**. Westview, Boulder, Colo, pp. 3-33. 1998.
- BILLEN, J.; GRASSO, D. A.; MORI, A. & LE MOLI, F. Structural and functional changes of the Dufour gland in gynes of the amazon ant *Polyergus rufescens* (Hymenoptera, Formicidae). **Zoomorphology**. 121:55–61. 2001.
- BILLEN, J. A importância de glândulas exócrinas na sociedade de insetos. In: VILELA, E.F.; DOS SANTOS, I.A.; SCHOEREDER, J.H.; SERRÃO, J.E.; CAMPOS, L.A.O. & LINO-NETO, J. (Eds). **Insetos Sociais: da**

- Biologia à Aplicação.** Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, pp.87-92. 2008.
- COSTA-LEONARDO, A.M. Glândulas intramandibulares em abelhas sociais. **Ciência e Cultura.** 30:835-838. 1978.
- COSTA, C. & VANIN, S.A. On the concepts of “pre-pupa”, with special reference to the Coleoptera. **Revista Brasileira de Zoologia.** 2:339-345.1985.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e funções de sistemas.** SÃO PAULO: UNESP, 408p. 2009.
- CRUZ-LANDIM, C. & ABDALLA, F.C. **Glândulas exócrinas das abelhas.** Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 181 p. 2002.
- CRUZ-LANDIM, C; GRACIOLI-VITTI, L. F. & ABDALLA, F.C. Ultrastructure of the intramandibular gland of workers and queens of the stingless bee, *Melipona quadrifasciata* (Meliponini). **Journal of Insect Science.** 11:1-9. 2011.
- GAMA, V. Desenvolvimento pós-embriônico das glândulas componentes do sistema salivar de *Camponotus* (Myrmothrix) *rufipes* (Fabricius, 1775) (Hymenoptera: Formicidae). **Arquivos de Zoologia.** 29:133-183. 1978.
- GRASSO, D.A.; ROMANI, R.; CASTRACANI, C.; VISICCHIO, R.; MORI, A., ISIDORO, N. & LE MOLI, F. Mandible associated glands in queens of the slave-making ant *Polyergus rufescens* (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux.** 51:74-80. 2004.
- GULLAN, P. J. & CRANSTON, P. S. **Os insetos: um resumo de entomologia.** 3 ed. São Paulo: Roca. 440p. 2008.

- HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E.O. **The ants.** Cambridge, Belknap/Harvard University Press. 732p. 1990.
- KUSNEZOV, N. Evolución de las hormigas. **Dusenía.** 6:1-34. 1955.
- LOMMELEN E., SCHOETERS, E. & BILLEN, J. Development of the labial gland of the ponerine ant *Pachycondyla obscuricornis* (Hymenoptera, Formicidae) during the pupal stage. **Arthropod Structure & Development.** 32:209-217. 2003.
- MARTINS, L.C.B. & SERRÃO, J.E. Morphology and histochemistry of the intramandibular glands in Attini and Ponerini (Hymenoptera, Formicidae) species. **Microscopy Research and Technique.** 74:763-771. 2011.
- NEDEL, O.J. Morphologie und physiologie der mandibeldrüse einiger bienen arten (Apidae). **Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere.** 49:139-83. 1960.
- NOIROT, C. & QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. **Annual Review of Entomology.** 19:61-80. 1974.
- NOIROT, C. & QUENNEDEY, A. Glands, gland cells, glandular units: Some comments on terminology and classification. **Annales de la Société Entomologique de France.** 27:123-128. 1991.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: Theoretical and Applied.** Churchill Livingstone. 2:624p. 1985.
- PEETERS, C. & CREWE, R.M. Insemination controls the reproductive division of labour in a Ponerine ant. **Naturwissenschaften.** 71:50-51. 1984.

- QUENNEDEY, A. Insect epidermal gland cells: ultrastructure and morphogenesis. **Microscopy Anatomy of Invertebrates**. 11A:177-207. 1998.
- RIBEIRO, M & CAETANO, F.H. **Cytochemistry for visualization of the Golgi complex in the intramandibular gland of old major workers of *Zacryptocerus pusillus* (Hymenoptera, Formicidae)**. *ICEM 14 Cancun*. 749-750p. 2000.
- ROUX, O.; BILLEN, J.; ORIVEL, J. & DEJEAN, A. An overlooked mandibular- rubbing behavior used during recruitment by the african weaver ant, *Oecophylla longinoda*. **PLoS ONE**. 5(2): e8957 doi: 10.1371/journal.pone.0008957.2010.
- SANTOS, C.G.; MEGIOLARO, F.; SERRÃO, J.E. & BLOCHTEIN, B. Morphology of the head salivary and intramandibular glands of the stingless bee *Plebeia emerina* (Friese) (Hymenoptera, Meliponini) workers associated with propolis. **Annals of the Entomological Society of America**. 102:137-143. 2009.
- SCHOETERS, E. & BILLEN, J. The intramandibular gland, a novel exocrine structure in ants (Insecta, Hymenoptera). **Zoomorphology**. 114:125-131. 1994.
- STEFANINI, M.; DEMARTINO, C. & ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature**. 216:173-174. 1967.
- TOLEDO, L.F.A. Histo-anatomia de glândulas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera). **Arquivo do Instituto Biológico**. 34:321-329. 1967.

## CAPÍTULO 2

### GLÂNDULAS INTRAMANDIBULARES NAS DIFERENTES CASTAS DA FORMIGA CORTADEIRA, *Atta laevigata* (FR. SMITH, 1858) (FORMICIDAE, ATTINI).

#### RESUMO

As glândulas intramandibulares têm sido pouco estudadas em formigas, sendo menos ainda entre suas diferentes castas, apesar das evidentes diferenças funcionais entre elas. As formigas cortadeiras possuem um dos mais complexos sistemas de comunicação e divisão de trabalho com castas polimórficas, o que as fazem um modelo apropriado para o estudo das glândulas intramandibulares. O conhecimento da morfologia interna da mandíbula de formigas é importante para a elucidação dos mecanismos que envolvem o sistema exócrino e suas relações com os aspectos comportamentais das diferentes castas dentro da colônia. Este estudo teve por objetivo investigar a ocorrência de glândulas intramandibulares nas castas e subcastas da formiga cortadeira *Atta laevigata*. Mandíbulas de rainha, operária maior, operária menor e soldado foram submetidas à análises histológicas, histoquímicas e morfométricas. Em todas as castas foram encontradas glândulas unicelulares da classe III e células epidérmicas secretoras com reservatório. Rainhas e soldados apresentaram diferença na quantidade de glândulas unicelulares da classe III distribuídas pelo interior da mandíbula e maior tamanho dessas glândulas, as quais contêm granulações citoplasmáticas e estoques de lipídios neutros. Os resultados histoquímicos PAS, Mercúrio Bromofenol e Azul do Nilo, para glândulas

unicelulares da classe III e células epidérmicas secretoras com reservatório foram semelhantes; no entanto, demonstraram diferenças nos resultados entre as castas. A evidenciação de carboidratos (PAS) foi fortemente positiva em todas as castas; houve positividade para evidenciação de lipídio neutro (Azul do Nilo) apenas em rainhas e soldados; a evidenciação de proteínas (Mercúrio Bromofenol) em rainhas foi fracamente positiva, e em soldados, operárias maiores e operárias menores, essa reação foi positiva. Os estudos das glândulas intramandibulares em *A. laevigata* suportam a evidência dessas glândulas estarem envolvidas diretamente na divisão de trabalho e conseqüentemente na comunicação química entre castas.

**INTRAMANDIBULAR GLANDS IN DIFFERENT CASTES OF A LEAF-CUTTING ANT, *Atta laevigata* (FR. SMITH, 1858) (FORMICIDAE, ATTINI)**

**ABSTRACT**

The intramandibular glands have been little studied in ants, even less between their different castes, despite the obvious functional differences between them. The leaf-cutting ants have one of the most complex systems of communication and division of labor that is polymorphic and make them a good model for the study of intramandibular glands. The knowledge of the internal morphology of the ants mandible is important for elucidating the mechanisms that involve the exocrine system and its relation with the different behavior aspects of different castes within the colony. This study aimed to investigate the occurrence of intramandibular glands in castes and subcastes of the ant *Atta laevigata*. Mandibles of queen, major and minor workers and soldiers were submitted to histological, histochemical and morphometric analyses. In all castes were found unicellular glands belonging to class III and secretory epidermal cells with reservoirs. Queens and soldiers showed different number of unicellular glands belonging to class III, distributed through the mandible interior, and besides, were found larger size of these glands, which contain cytoplasm and stocks of neutral lipids. The histochemical tests PAS, mercury-bromophenol and Blue Nile, to unicellular glands of the class III and secretory epidermal cells with reservoir were similar. However, the tests showed differences between the castes. The evidence of carbohydrates (PAS) was strongly positive in all castes; was positivity evidence of neutral lipid (Blue Nile) for queens and soldiers only.

The protein staining (mercury-bromophenol blue) in queens was weakly positive, and soldiers, major and minor workers, the reaction was positive. Studies of intramandibular glands in *A. laevigata* support the evidence of these glands are directly involved in the division of labor and consequently in the chemical communication between the castes.

## 1. INTRODUÇÃO

As formigas são insetos exclusivamente eussociais, vivendo em colônias onde as gerações se sobrepõem, com cuidado cooperativo à prole e divisão de trabalho reprodutivo, com fêmeas férteis e estéreis (Wilson, 1971; Hölldobler & Wilson, 1990). A divisão de trabalho em suas colônias ocorre devido a um sistema de castas, compreendendo um grupo reprodutivo restrito a uma ou mais rainhas, ajudadas pelas operárias e em algumas espécies, a um grupo adicional de soldados para defesa (Hölldobler & Wilson 1990).

Padrões de divisão de trabalho são reconhecidos em insetos sociais, sendo o polietismo etário relacionado com a idade e o polimorfismo relacionado ao tamanho ou forma do indivíduo (Hölldobler & Wilson, 1990).

As formigas Attini incluem as conhecidas cortadeiras e merecem atenção especial neste contexto uma vez que possuem um dos mais complexos sistemas de divisão de trabalho (Wilson, 1980; Della Lucia, 1993 e 2011). O cultivo do fungo simbiote com folhas conduziu a uma grande especialização dos atos comportamentais em função do seu tamanho, uma vez que operárias menores exercem a função de cultivar o fungo. Essa associação se tornou um sucesso em *Atta* e *Acromyrmex* (Schultz, 1999).

Em espécies de *Atta*, o polimorfismo das operárias conduz a uma distinta divisão de trabalho entre subcastas físicas, nas quais as maiores operárias (soldados) são especializadas na defesa da colônia, operárias médias forrageiam e as operárias menores são especializadas para o trabalho dentro do jardim de fungo (Wilson, 1980).

As operárias adultas na maioria das espécies de insetos sociais mudam de atividade à medida que envelhecem. Cada espécie apresenta seu próprio modelo de polietismo temporal ou etário, e muitas dessas modificações são seguidas por alterações nas glândulas exócrinas (Della Lucia, 1993).

Uma das características comuns aos insetos sociais é a diversidade de glândulas distribuídas por todo o corpo (Billen, 2009). O alto número e diversidade dessas glândulas acompanham as várias funções que suas secreções desempenham na vida destes insetos (Hölldobler & Wilson, 1990; Noirot & Quennedey, 1991; Billen & Morgan, 1998; Billen, 2009). Até o presente, essa variedade de glândulas chega a um total de 105 glândulas exócrinas conhecidas que podem ser distinguidas entre os vários grupos de insetos sociais (Billen, 2008).

As glândulas mandibulares e intramandibulares fazem parte do sistema salivar dos insetos e estão presentes nos adultos de todas as espécies dos himenópteros (Cruz-Landim & Abdalla, 2002). As glândulas mandibulares são as mais estudadas e conhecidas, portanto quase sempre é a elas que se refere o conhecimento sob a rubrica de “glândulas mandibulares”, distinguindo-se delas as glândulas intramandibulares que foram menos estudadas (Cruz-Landim & Abdalla, 2002).

As glândulas intramandibulares enquadram-se na categoria de glândulas tegumentares (Cruz-Landim & Abdalla, 2002) e, em formigas, essas glândulas foram descritas pela primeira vez por Toledo (1967) em *Atta sexdens rubropilosa*. Nas formigas, elas podem ser divididas em células epidérmicas secretoras da classe I e glândulas unicelulares da classe III

(Noirot & Quennedey 1991, 1974; Cruz-Landim & Abdalla, 2002; Billen, 2009; Martins & Serrão, 2011), e células epidérmicas secretoras com reservatório (Amaral & Caetano, 2006; Billen, 2009; Martins & Serrão, 2011).

A morfologia, ultra-estrutura e fisiologia das glândulas intramandibulares já foram estudadas em algumas espécies de Hymenoptera (Nedel, 1960; Toledo, 1967; Costa-Leonardo, 1978; Schoeters & Billen, 1994; Ribeiro & Caetano, 2000; Billen & Espadaler, 2002; Cruz-Landim & Abdalla, 2002; Grasso et al., 2004; Santos, et al. 2009; Roux et al., 2010; Cruz-Landim et al., 2011; Martins & Serrão, 2011). No entanto, apenas em *Atta sexdens rubropilosa* há um estudo comparativo das glândulas intramandibulares em diferentes castas (Amaral & Caetano, 2006).

O conhecimento das glândulas intramandibulares de formigas é importante para a elucidação dos mecanismos que envolvem o sistema exócrino e suas relações com os aspectos comportamentais das diferentes castas e subcastas dentro da colônia. Assim, este estudo teve por objetivo investigar a ocorrência, morfologia e a histoquímica das glândulas intramandibulares nas diferentes castas de formiga cortadeira *Atta laevigata*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Formigas**

Três colônias de *A. laevigata* foram obtidas por coletas manuais no município de Teixeiras no Estado de Minas Gerais, Brasil, e cedidas pelo Laboratório de Formigas Cortadeiras da Universidade Federal de Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil.

Para casta de rainha foram utilizados três indivíduos fisogástricos, um de cada colônia. Para as subcastas operária maior, operária menor e soldado, foram utilizados três indivíduos de cada colônia com base na largura da cápsula cefálica, sendo: as operárias menores <1,5 mm, operárias maiores 2,0-2,5 mm, e os soldados >3,0 mm de cápsula cefálica.

## **2.2. Histologia**

No estudo histológico, os indivíduos de cada casta foram previamente transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) e tiveram as mandíbulas removidas. Em seguida, estas foram desidratadas em série crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e embebidas em historesina Leica. Após a polimerização, as peças foram seccionadas longitudinalmente com 3 µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina.

## **2.3. Histoquímica**

Algumas secções histológicas das mandíbulas obtidas para as análises histológicas foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos: Mercúrio-bromofenol para evidenciação de proteínas, PAS (Ácido Periódico Schiff) para evidenciação de polissacarídeos e glico-conjugados, e azul do Nilo para identificação de lipídios, segundo Pearse (1985), Bancroft & Gamble (2007).

## **2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura**

As mandíbulas das formigas foram removidas, desidratadas em séries alcoólicas crescentes, transferidas para hexametildilazane (HMDS) durante 5

minutos e secas ao ar. A seguir, foram coladas em suportes de alumínio, metalizadas com ouro (20 nm) e observadas no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO VP1430 do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## **2.5 Morfometria**

### **2.5.1 Morfometria das glândulas intramandibulares – glândulas unicelulares da classe III**

As glândulas foram selecionadas aleatoriamente, e as medidas da área celular total, a área do núcleo, área do citoplasma e a relação núcleo/citoplasma foram obtidas com auxílio do software Image Pro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics Inc.). Os dados morfométricos foram obtidos a partir de dez secções histológicas das glândulas intramandibulares de rainha (n = 3), soldado (n = 3), operária maior (n = 3) e operária menor (n = 3).

### **2.5.2 Morfometria da cápsula cefálica das formigas**

O estudo morfométrico foi realizado utilizando rainha, soldado, operária maior e operária menor. Esses foram separados por classes de tamanho através de medidas da cápsula cefálica como já informado no tópico 2.1.

As medidas foram realizadas com o auxílio de uma ocular micrométrica acoplada a microscópio estereoscópico e suas medidas adotadas foram a largura da cápsula cefálica, tomada como a largura entre os olhos.

## 2.6 Análise estatística

Para testar se o tamanho da área celular varia entre as castas de formigas (rainha, soldado, operária maior e operária menor), os dados foram submetidos a modelagem linear generalizada (GLM), com distribuição de erros normal. O modelo estatístico criado foi o tamanho da área celular (y) e as diferentes castas de formigas (x). A análise foi testada através do software R (R development Core Team, 2009), seguida por análise de resíduos, a fim de verificar a aceitabilidade do modelo utilizado e ocorrência de sobredispersão.

## 3. RESULTADOS

Em *A. laevigata*, todas as castas estudadas apresentaram glândulas intramandibulares, caracterizadas por glândulas unicelulares da classe III (Figura 1) e células epidérmicas secretoras com reservatório (Figura 2).

As glândulas unicelulares da classe III encontram-se destacadas da epiderme, sendo geralmente esféricas e providas de um canal que as liga a um poro na cutícula, onde a secreção é descarregada pela face superior da mandíbula (Figura 1). Os poros estão presentes apenas na face superior da mandíbula (Figura 3 e 4).

As glândulas unicelulares da classe III apresentam morfologia variada, dependendo da casta. Neste sentido, rainhas, soldados e operárias menores apresentaram células com citoplasma vacuolizado (Figuras 5 a 8, 11 e 12) quando comparado ao das operárias maiores (Figuras 9 e 10). Apenas em rainhas e na subcasta soldado, foram evidenciadas granulações

citoplasmáticas (Figura 6). Em todas as castas, o núcleo apresenta predomínio de cromatina descondensada.

As glândulas unicelulares da classe III em rainhas apresentaram área celular total de  $241,04 \mu\text{m}^2$ , enquanto as subcastas soldado, operária maior e operária menor apresentaram áreas celulares de 272,76, 138,64 e  $108,56 \mu\text{m}^2$  respectivamente, sendo que operária maior apresentou maior relação núcleo/citoplasma (Tabela 1).

O tamanho da área celular das glândulas unicelulares da classe III mostrou diferenças significativas nas castas ( $F=34,60$ ;  $p<0,0001$ ), sendo que, em operária maior e operária menor não houve diferença entre elas; rainha e soldado também foram similares (Figura 13).

A quantidade das glândulas unicelulares da classe III variou entre as castas. Estas glândulas foram pouco numerosas em operária maior (Figuras 9 e 10) e operária menor (Figuras 11 e 12); a rainha apresentou um aglomerado de glândulas desenvolvidas, porém não preenchendo toda a mandíbula (Figuras 5 e 6), enquanto nos soldados elas ocuparam grande parte do interior da mandíbula formando agregados de células bem desenvolvidas (Figuras 7 e 8).

As análises histoquímicas das glândulas unicelulares da classe III demonstraram diferenças entre as castas (Tabela 2), exceto no caso do PAS onde houve forte reação para carboidratos em todas as castas (Figuras 14 a 17). Houve fraca reação para proteínas em rainhas (Figura 18); enquanto que a reação foi positiva para evidenciar proteínas em soldados, operárias maiores e menores (Figuras 19 a 21); e positiva para evidênciação de

lipídios neutros (Azul do Nilo) apenas em rainhas e soldados (Figuras 22 e 23).

As células epidérmicas secretoras com reservatório são formadas pela hipertrofia das células epidérmicas, contendo um reservatório no interior da mandíbula (Figura 2). O epitélio de revestimento da mandíbula que corresponde a porção não secretória em todas as castas é composto por células achatadas (Figura 24), com núcleos com predomínio de cromatina condensada.

As análises histoquímicas dos reservatórios das glândulas epidérmicas também apresentaram diferenças entre as castas e seus resultados foram semelhantes aos encontrados no citoplasma das glândulas unicelulares da classe III (Tabela 2). A marcação para carboidratos (PAS) foi fortemente positiva em todas as castas (Figura 25); também houve positividade para lipídios neutros (Azul do Nilo) em rainhas e soldados (Figura 26); fracamente positiva para evidenciar proteínas (Mercúrio Bromofenol) em rainhas; e positiva para evidenciar proteínas, em operárias maiores e menores (Figura 27).

#### **4. DISCUSSÃO**

A ocorrência de glândulas intramandibulares, como glândulas unicelulares da classe III em *A. laevigata*, reforça que isso é uma característica comum aos Hymenoptera sociais, uma vez que foi reportada para abelhas (Costa-Leonardo, 1978; Smith et al., 1993; Wossler et al., 2000; Cruz-Landim & Abdalla, 2002; Romani et al., 2002, 2003), vespas

(Romani et al., 2005) e formigas (Marques-Silva et al., 2006, Billen, 2008, Martins & Serrão 2011).

Nas castas de *A. laevigata*, os componentes químicos no citoplasma das glândulas unicelulares da classe III e nas células epidérmicas secretoras com reservatório, tais como proteína, lipídio neutro e carboidrato, sugerem alta atividade secretora dessas células. A presença de lipídio neutro apenas em rainha e soldado pode estar relacionada com a especialização dessas castas, tais como reprodução e defesa respectivamente, uma vez que espécies de insetos produzem odores nas secreções defensivas, feromônios atraentes, e hormônios, que contêm compostos de natureza lipídica (Gilby, 1965). A presença de todas essas substâncias químicas provavelmente ocorre pelo fato das Attini possuírem espécies de maior complexidade. De acordo com Cruz-Landim & Abdalla (2002), nas espécies eussociais, a distribuição das glândulas é também característica das castas, e os produtos dessas glândulas podem ser elementos importantes para a comunicação dentro da espécie, atuando nos processos de integração social, acasalamento, defesa, coleta e armazenamento de alimento, atração sexual, marcação de trilha e outros.

Em *A. laevigata*, o epitélio da mandíbula com células achatadas não caracteriza um epitélio glandular, diferentemente do observado em Ponerini onde este epitélio é caracterizado como células epidérmicas secretoras da classe I, possuindo células epidérmicas cúbicas ou colunares (Cruz-Landim & Abdalla, 2002; Martins & Serrão, 2011).

Embora não apresente células epidérmicas secretoras da classe I, *A. laevigata* tem células epidérmicas secretoras com reservatórios. Essa

diferença pode ser utilizada como caracter de valor filogenético que diferencia Ponerini e Attini, tribos com diferentes sistemas de castas (Martins & Serrão, 2011). Nas Ponerinae, o dimorfismo do sexo feminino é pouco marcado, sendo as rainhas e as operárias são muito semelhantes e a comunicação química incipiente (Wilson, 1971; Peeters & Crewe, 1984). As larvas de Ponerinae são bastante ativas e carnívoras; as colônias são relativamente pouco populosas, há pouca cooperação entre as operárias, que são características presumivelmente semelhantes ao ancestral (Kusnezov, 1955; Peeters & Crewe, 1984). Por outro lado, nas Myrmicinae cultivadoras de fungos, a divisão de trabalho entre as operárias se encontra também relacionada com o progresso de sua vida social, assim como o polimorfismo das castas operárias, estruturas do ninho, polietismo etário e outros, além de utilizarem para sua comunicação, na maioria das vezes, os sinais químicos (Wilson, 1971; Jaffé, 1984b). Nas attini superiores isso é mais evidenciado.

As funções das glândulas intramandibulares necessitam de maiores investigações, porém a existência de reservas de carboidratos, proteínas e lipídios em ambos tipos de glândulas intramandibulares de *A. laevigata* sugere a participação destas glândulas na produção de compostos envolvidos na comunicação química. Martins & Serrão (2011) mostraram que, possivelmente, as glândulas intramandibulares de Attini e Ponerini produzem substâncias de naturezas distintas e isso pode indicar funções diversas, dependendo da natureza química (substâncias glandulares) e ocorrência das glândulas (tipos). De acordo com Quennedey (1998), as glândulas unicelulares da classe III produzem feromônios de atração e

repulsa. Quennedey (1998) e Amaral & Caetano (2006) sugerem que, pelo fato das glândulas unicelulares da classe III terem demonstrado uma forte positividade para carboidratos e proteínas, a secreção liberada por esse tipo de célula está relacionada com a produção de enzimas, como também com a produção de muco. Schoeters & Billen (1994) afirmaram que as células glandulares classe III estão diretamente relacionadas com liberação de todas as secreções da glândula intramandibular. Pavon & Mathias (2005), estudando as glândulas mandibulares em indivíduos de três castas de *A. sexdens rubropilosa*, verificaram que a presença de grânulos de secreção lipídica sugere também uma possível ação de feromônios; as diferentes funções executadas pelas diferentes castas de insetos são diretamente dependentes dos produtos glandulares e, conseqüentemente, das características secretoras da célula (Pavon & Mathias, 2005).

Em *A. laevigata*, apenas as rainhas e soldados têm granulações citoplasmáticas, lipídios neutros e elevada diferença na quantidade de glândulas unicelulares da classe III distribuídas pelo interior da mandíbula, além do maior tamanho dessas glândulas. Isso pode indicar funções diversas dependendo da tarefa que cada casta exerce na colônia e pode atuar na comunicação intra e/ou interespecífica.

O tamanho da área celular mostrou diferenças significativas entre as castas; no entanto, não houve diferença nesse tamanho entre operária maior e operária menor, nem entre rainha e soldado. Baroni Urbani & Passera (1996) sugeriram que, contrariamente à crença estabelecida na literatura sobre formigas, os soldados representam uma casta paralela e com origem, independente das operárias. Baroni Urbani (1998) observou características

que fazem a casta soldado mais próxima das rainhas que das operárias, e todas as castas, no entanto, diferem entre si principalmente em fisiologia, morfologia e comportamento, e, apenas em parte, em tamanho ou em proporções.

Com isso, é possível especular que as glândulas intramandibulares, nas diferentes castas, podem indicar funções individualizadas e específicas de cada casta, que permanecem desconhecidas. Porém, diante do resultado diferenciado em rainha e soldado das demais subcastas de *A. laevigata*, sugere-se que essas glândulas possam estar atuando na liberação de feromônios atrativos nas rainhas e feromônios de alarme e defesa na casta soldado, enquanto nas operárias maiores e menores uma outra função seja desempenhada. Isso porque de acordo com Nascimento et al. (1993), Hernández et al. (1999), Hughes et al. (2001), Cruz-Landim (2009), a composição dos feromônios ou das substâncias químicas, pode variar entre as castas de formigas.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que as glândulas intramandibulares em *A. laevigata* apresentaram glândulas unicelulares da classe III e células epidérmicas secretoras com reservatório. Os estudos morfológicos, histoquímicos e morfométricos das glândulas intramandibulares em *A. laevigata* suportam a hipótese de que essas glândulas estejam envolvidas diretamente na divisão de trabalho entre as castas, e conseqüentemente na comunicação química.

## **AGRADECIMENTOS**

A FAPEMIG pela concessão da bolsa, e pelo suporte das agências de pesquisas brasileiras CNPq e SECTI/FAPESB-CNPq-PNX0011/2009. Ao Sr. Manoel Ferreira pelo auxílio técnico nas coletas e ao MSc Rômulo Augusto Cotta Dângelo pelo auxílio na morfometria das castas, ambos do Laboratório de Formigas Cortadeiras da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Ao MSc Paulo Fellipe Cristaldo do Laboratório de Termitologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela ajuda nas análises estatística.

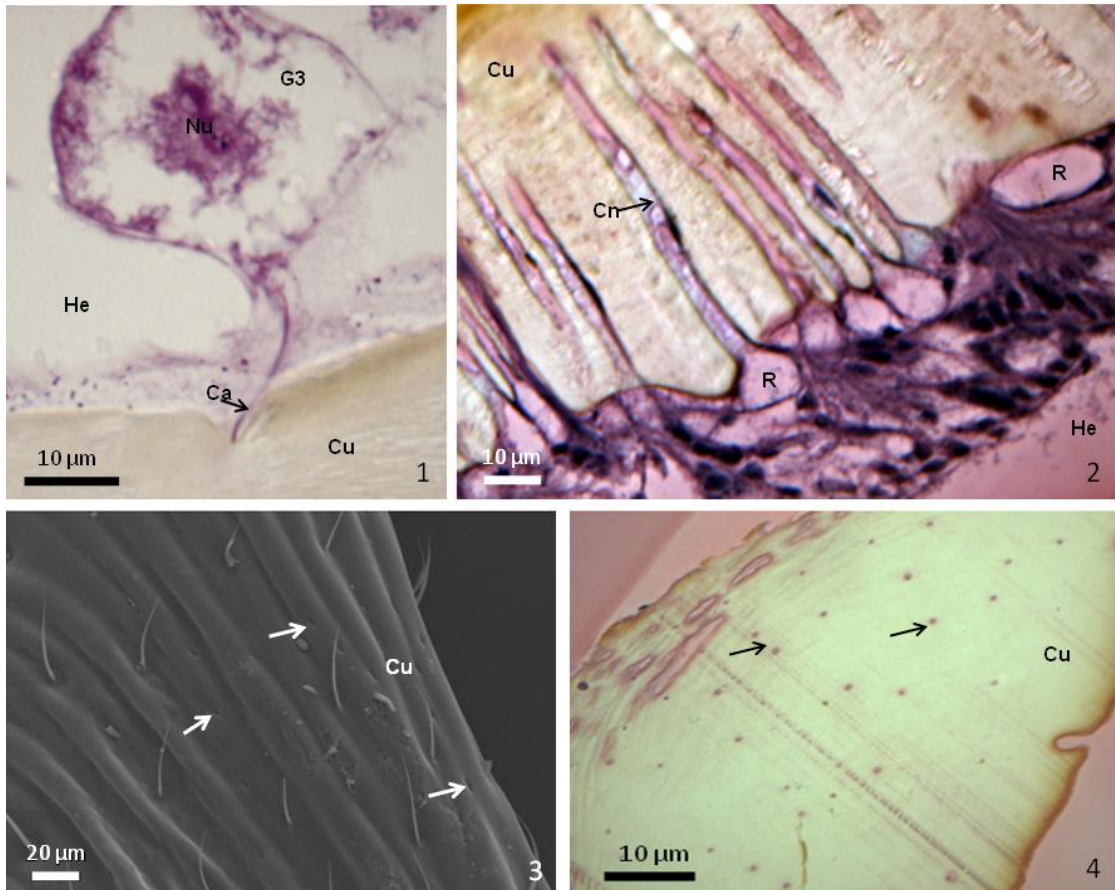
Tabela 1- Medidas (média  $\pm$  desvio padrão) das células secretoras da glândula intramandibular de diferentes castas de *Atta laevigata*.

Castas	Área Celular Total ( $\mu\text{m}^2$ )	Área Nuclear ( $\mu\text{m}^2$ )	Área Citoplasmática ( $\mu\text{m}^2$ )	Relação Núcleo/Citoplasma
Rainha	241,04 $\pm$ 59,11	20,58 $\pm$ 8,09	220,46 $\pm$ 52,37	0,09 $\pm$ 0,02
Soldado	272,76 $\pm$ 101,59	17,72 $\pm$ 8,40	255,04 $\pm$ 96,70	0,07 $\pm$ 0,03
Operária maior	138,64 $\pm$ 38,82	14,93 $\pm$ 3,85	123,70 $\pm$ 37,47	0,13 $\pm$ 0,04
Operária menor	108,56 $\pm$ 34,53	8,99 $\pm$ 4,20	99,57 $\pm$ 31,20	0,09 $\pm$ 0,02

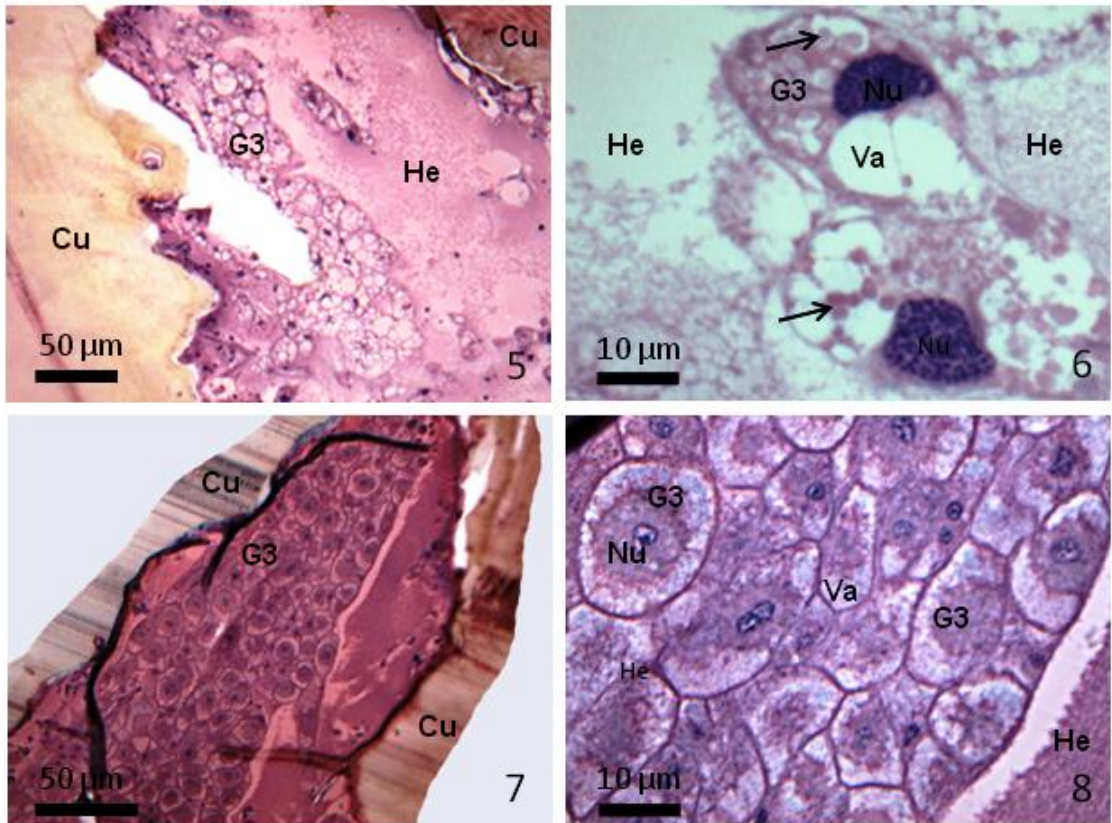
Tabela 2- Resultados dos testes histoquímicos das glândulas intramandibulares de diferentes castas de *Atta laevigata*.

Castas	Células secretoras da classe III			Glândula com reservatório		
	PAS	Mercúrio Bromofenol	Azul do Nilo	PAS	Mercúrio Bromofenol	Azul do Nilo
Rainha	+++	+	+++	+++	+	++
Soldado	+++	++	++	+++	nd	+
Operária maior	+++	++	-	+++	++	-
Operária menor	+++	++	-	+++	++	-

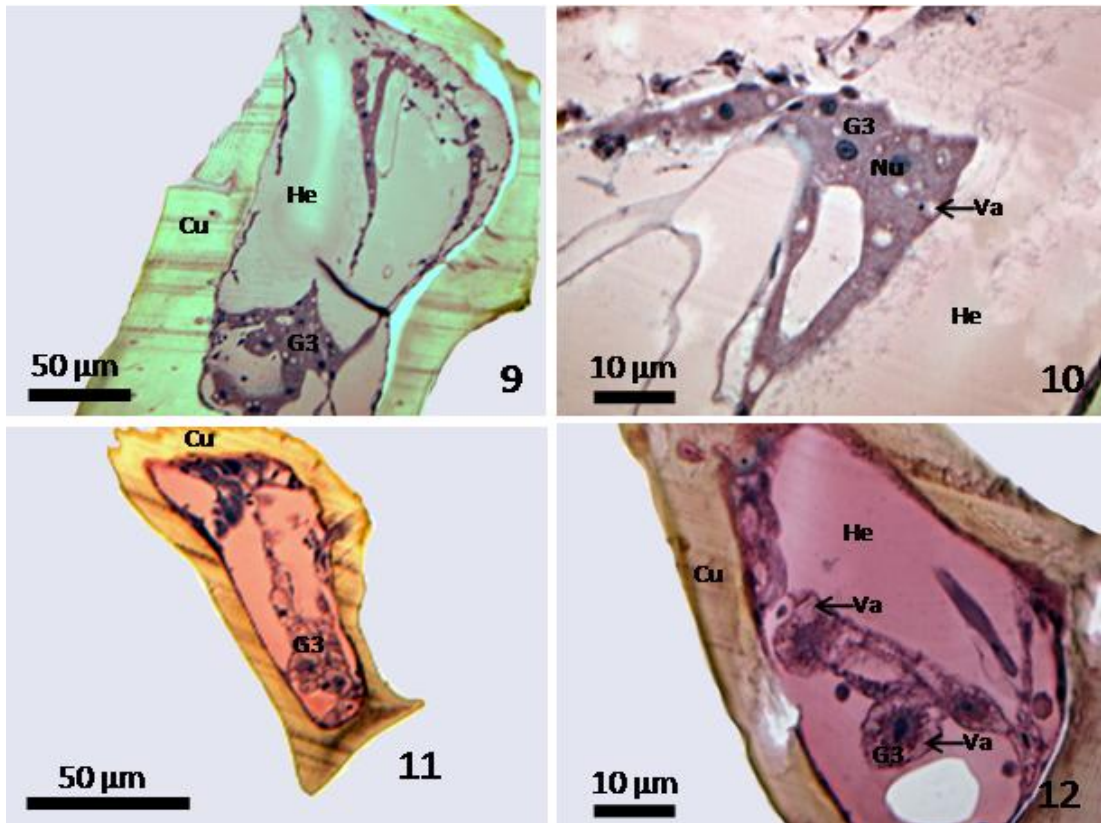
- ausência de reação, + reação fracamente positiva, ++ reação positiva, +++ reação fortemente positiva, nd – não determinado.



Figuras 1 e 2. Secções histológicas longitudinais da mandíbula de *Atta laevigata*. 1. Glândula intramandibular da classe III (G3) de rainha. 2. Células epiteliais secretoras com reservatório (R) de operária maior. Cu: cutícula. Ca: canaliculo. Cn: canal secretor. He: hemocele. 3. Micrografia mostrando face superior da mandíbula de operária maior vistas ao MEV evidenciando os poros externos (setas). 4. Secção histológica da face superior da mandíbula de operária maior evidenciando poros (setas). Cu: cutícula.



Figuras 5 - 8. Secções histológicas longitudinal da mandíbula de *Atta laevigata*. 5 e 6 rainha. 7 e 8 soldado. Cu: cutícula, G3: glândula intramandibular classe III, He: hemocele, Nu: núcleo, Va: vacúolo, seta: grânulos.



Figuras 9 - 12. Secções histológicas longitudinal da mandíbula de *Atta laevigata*. 9 e 10 operária maior. 11 e 12 operária menor. Cu: cutícula, G3: glândula intramandibular classe III, He: hemocele, Nu: núcleo, Va: vacúolo, seta: grânulos.

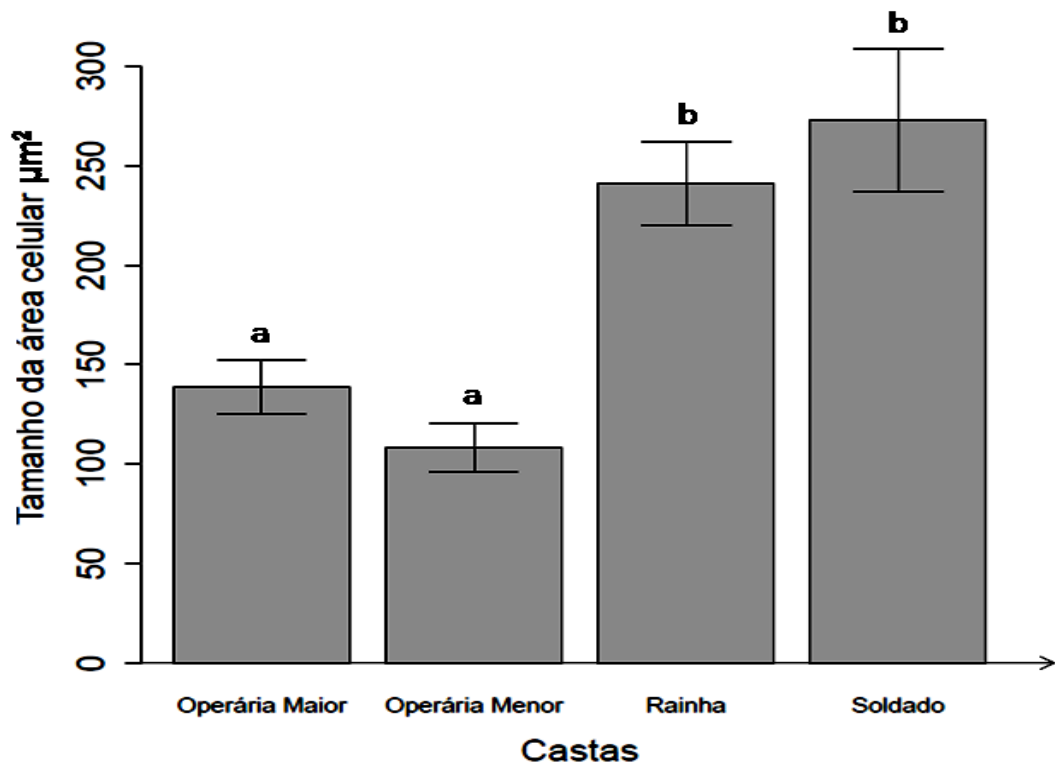


Figura 13. Relação morfométrica entre o tamanho da área celular ( $\mu\text{m}^2$ ) das glândulas intramandibulares da classe III e as castas de formigas (rainha, soldado, operária maior e operária menor). O tamanho da área celular foi significativamente diferente entre as castas ( $p < 0,0001$ ), no entanto, não houve diferença entre operária maior e operária menor, nem entre rainha e soldado.

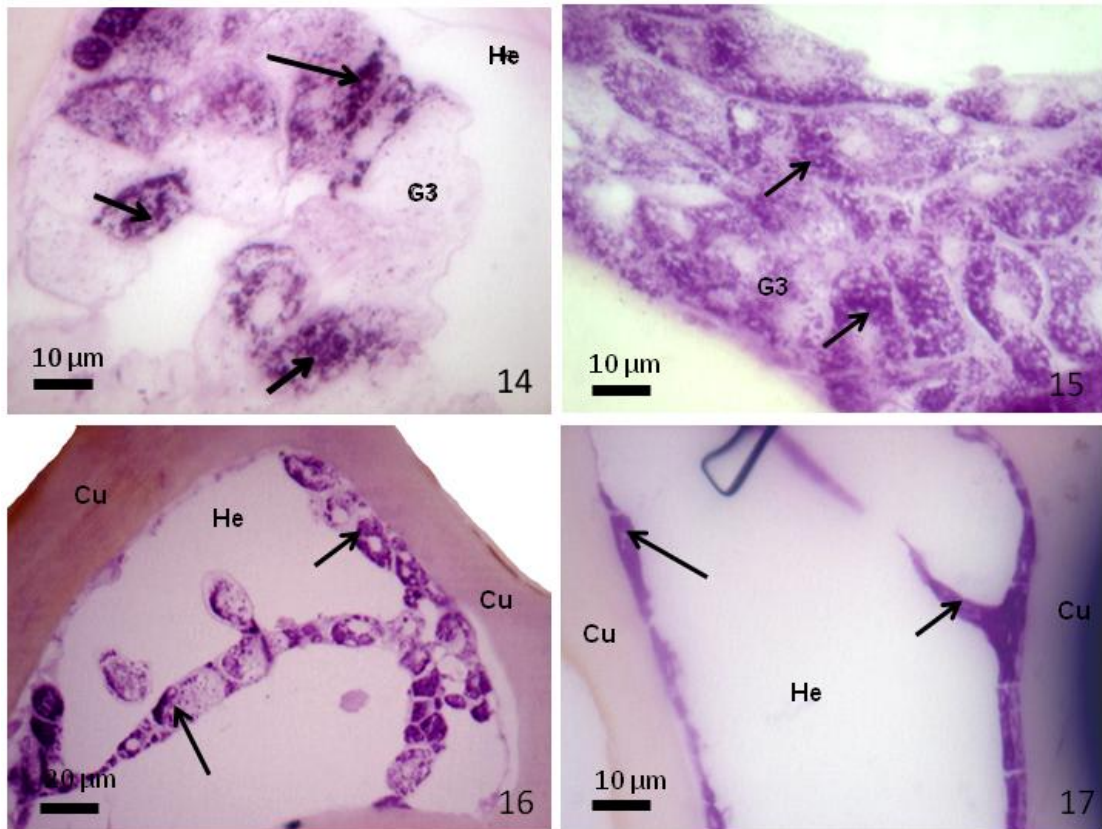


Figura 14 - 17. Secções histológicas das mandíbulas com testes histoquímicos em células secretoras classe III em diferentes castas de *Atta laevigata*. Os testes foram fortemente positivos para glicoconjugados (PAS) em todas as castas (seta). 14. Rainha. 15. Soldado. 16. Operária maior. 17. Operária menor. Cu: cutícula, G3: glândula intramandibular classe III, He: hemocele.

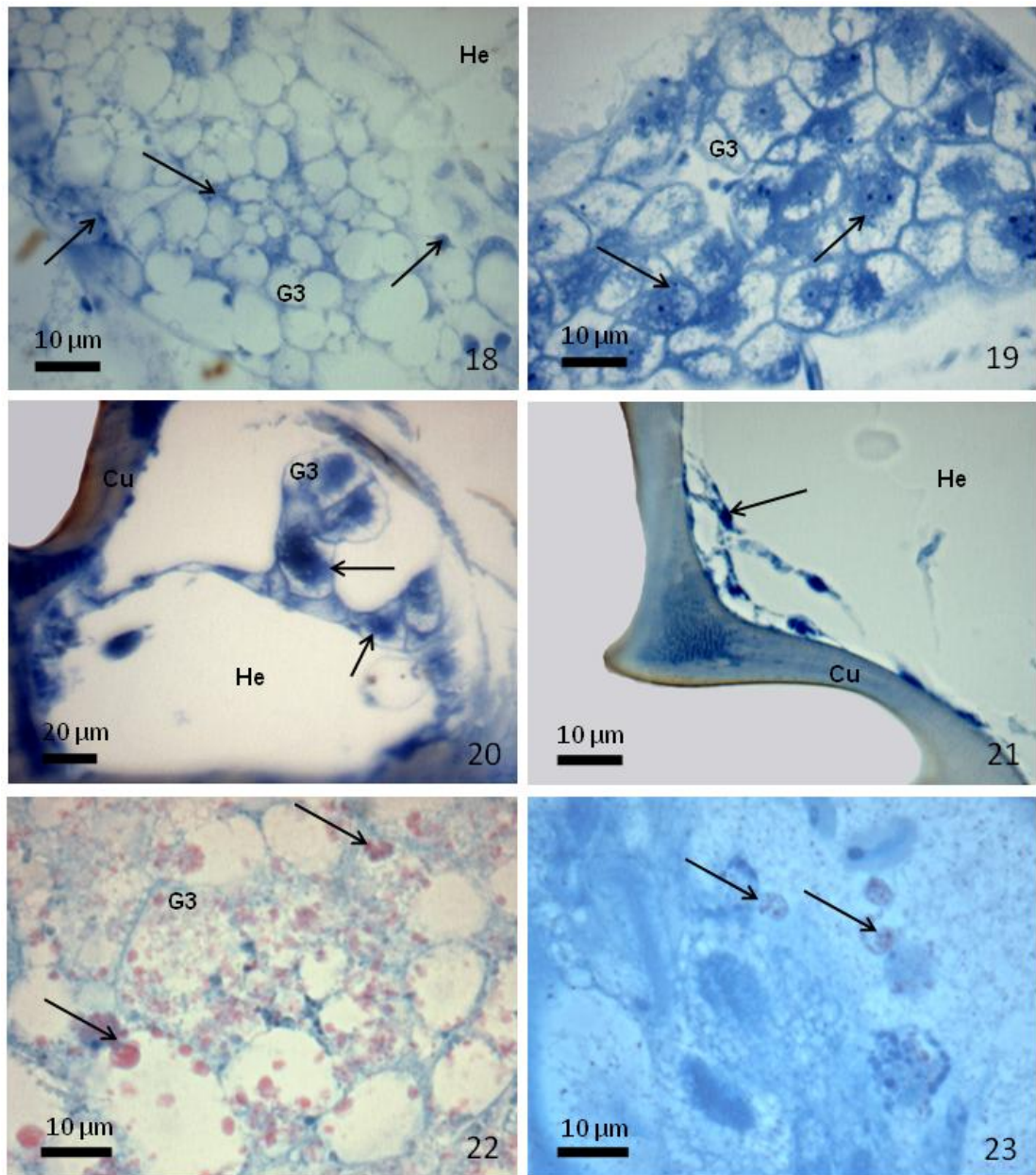
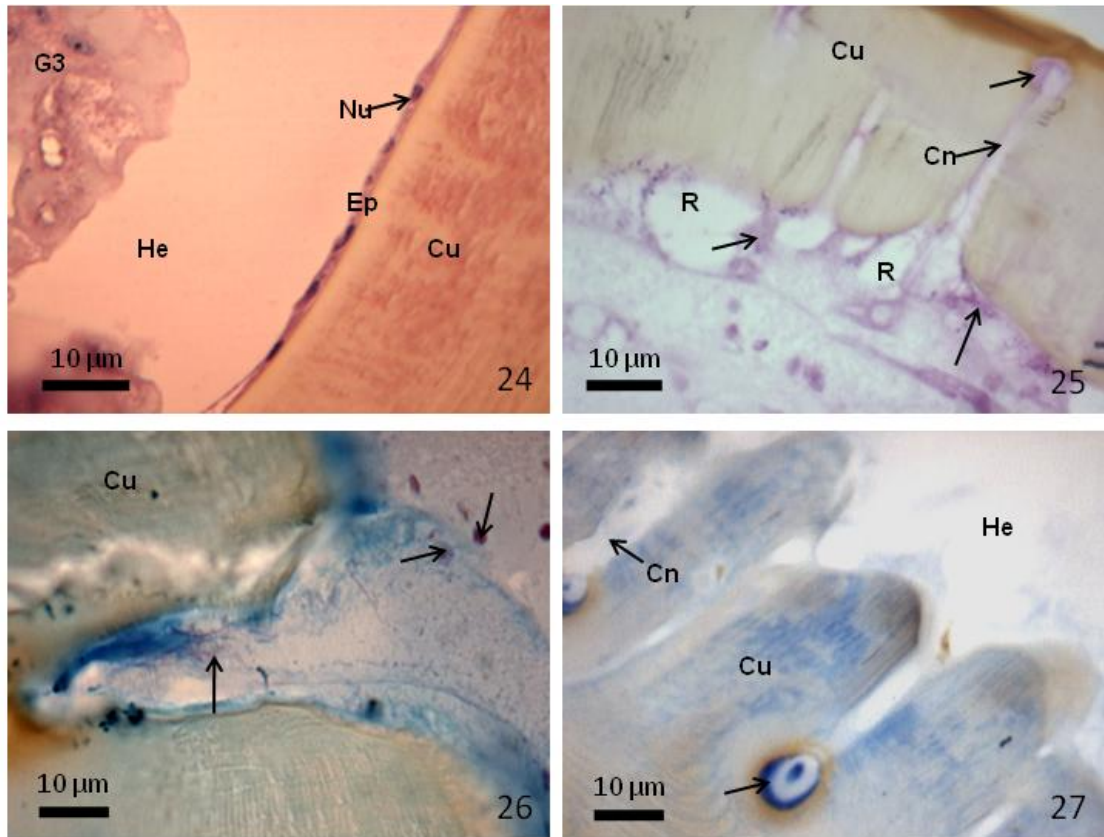


Figura 18 - 23. Secções histológicas das mandíbulas com testes histoquímicos em células secretoras classe III em diferentes castas de *Atta laevigata*. 18-21. Positividade nos testes para proteínas (mercúrio-bromofenol) em todas as castas (setas). 18. Rainha, reação fracamente positiva. 19. Soldado, reação positiva. 20. Operária maior, reação positiva. 21. Operária menor, reação positiva. 22 e 23. Reação positiva para lipídio neutro (azul do Nilo) (seta). 22. Rainha. 23. Soldado. Cu: cutícula, G3: glândula intramandibular classe III, He: hemocele.



Figuras 24-27. Secções histológicas das mandíbulas em *Atta laevigata*. 24: Epiderme com células achatadas (Ep) e células glandulares classe III (G3). 25-27. Secção histológica da mandíbula com testes histoquímicos dos reservatórios glandulares do epitélio de rainhas. 25. Teste positivo para glicoconjugados (PAS) (seta). 26. Teste positivo para lipídio neutro (azul do Nilo) (seta). 27: Teste fracamente positivo para proteínas (Mercúrio-bromofenol) (seta). Cu: cutícula. Cn: canal secretor. He: hemocele.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, J.B. & CAETANO, F.H. The intramandibular gland of leaf-cutting ants (*Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908). **Micron**. 37:154-160. 2006.
- BANCROFT, J.D. & GAMBLE, M. **Theory and Practice of Histological Techniques**. Churchill Livingstone. 6<sup>a</sup> edição. 744 p. 2007.
- BARONI URBANI, C. The number of castes in ants, where major is smaller than minor and queens wear the shield of the soldiers. **Insectes Sociaux**. 45:315-333.1998.
- BARONI URBANI, C. & PASSERA L. Origin of ant soldiers. **Nature**. 383:223. 1996.
- BILLEN, J. & ESPADALER, X. A novel epithelial intramandibular gland in the ant *Pyramica membranifera* (Hymenoptera, Formicidae). **Belgian Journal of Zoology**. 132: 175-176. 2002.
- BILLEN, J. & MORGAN, E.D. Pheromone communication in social insects – sources and secretions. In: VANDER MEER, R.K, BREED, M.D, ESPELIE, K.E & WINSTON, M.L (EDS) **Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites**. Westview, Boulder, Colo, pp. 3-33. 1998.
- BILLEN, J. A importância de glândulas exócrinas na sociedade de insetos. In: VILELA, E.F.; DOS SANTOS, I.A.; SCHOEREDER, J.H.; SERRÃO, J.E.; CAMPOS, L.A.O. & LINO-NETO, J. (Eds). **Insetos Sociais. Da Biologia à Aplicação**. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, pp.87-92. 2008.

- BILLEN J. Occurrence and structural organization of the exocrine glands in the legs of ants. **Arthropod Structure & Development**. 38:2-15. 2009.
- COSTA-LEONARDO, A.M. Glândulas intramandibulares em abelhas sociais. **Ciência e Cultura**. 30:835-838. 1978.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e funções de sistemas**. SÃO PAULO: UNESP, 408p. 2009.
- CRUZ-LANDIM, C. & ABDALLA, F.C. **Glândulas exócrinas das abelhas**. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 181 p. 2002.
- CRUZ-LANDIM, C; GRACIOLI-VITTI, L.F. & ABDALLA, F.C. Ultrastructure of the intramandibular gland of workers and queens of the stingless bee, *Melipona quadrifasciata* (Meliponini). **Journal of Insect Science**. 11:1-9. 2011.
- DELLA LUCIA, T.M.C. **As Formigas Cortadeiras**. Viçosa, 262 p. (Ed.). 1993.
- DELLA LUCIA, T.M.C. **Formigas-Cortadeiras da Bioecologia ao Manejo**. 1ª. ed. Viçosa: Editora UFV, v. 1. 419 p. 2011.
- GILBY, A.R. Lipids and their metabolism in insects. **Annual Reviews**.10:141-160. 1965.
- GRASSO, D.A.; ROMANI, R.; CASTRACANI, C.; VISICCHIO, R.; MORI, A., ISIDORO, N. & LE MOLI, F. Mandible associated glands in queens of the slave-making ant *Polyergus rufescens* (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux**. 51:74-80. 2004.
- HERNÁNDEZ, J.V.; CABRERA, A. & JAFFÉ, K. Mandibular gland secretion in different caste of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*. **Journal of Chemical Ecology**. 25:2433-2444. 1999.

- HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge, Belknap/Harvard University Press. 732 p. 1990.
- HUGHES, W.O.H., HOWSE, P.E. & GOULSON, D. Mandibular gland chemistry of grass-cutting ants: species, caste, and colony variation. **Journal of Chemical Ecology**. 27:109-124. 2001.
- JAFÉ, K. Evolución de los sistemas de comunicación química en hormigas (Hymenoptera, Formicidae). **Folia Entomologica Mexicana**. 61:189-203. 1984b.
- KUSNEZOV, N. Evolución de las hormigas. **Dusenía**. 6:1-34. 1955.
- MARQUES-SILVA S, GUSS C.P.M, DELABIE J.H.C, MARIANO, C.S.F, ZANUNCIO, J.C. & SERRAO, J.E. Sensilla and Secretory Glands in the Antennae of a Primitive Ant: *Dinoponera lucida* (Formicidae, Ponerinae). **Microscopy Research and Technique**. 69:885-890. 2006.
- MARTINS, L.C.B. & SERRÃO, J. E. Morphology and histochemistry of the intramandibular glands in Attini and Ponerini (Hymenoptera, Formicidae) species. **Microscopy Research and Technique**. 74:763-771. 2011.
- NASCIMENTO, R., MORGAN, E.D., BILLEN, J., SCHOETERS, E., DELLA-LUCIA, T.M.C, & BENTO, J.M. Variation with the caste of the mandibular gland secretion in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Journal of Chemical Ecology**. 19:907-918. 1993.
- NEDEL, O.J. Morphologie und Physiologie der Mandibeldrüse einiger Bienen Arten (Apidae). **Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere**. 49:139-83. 1960.

- NOIROT, C. & QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. **Annual Review of Entomology**. 19:61-80. 1974.
- NOIROT, C. & QUENNEDEY A. 1991. Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. *Annales de la Société Entomologique de France*. 27:123-128. 1991.
- PAVON, L.F. & CAMARGO-MATHIAS, M.I.C. Ultrastructural studies of the mandibular glands of the minima, media and soldier ants of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel 1908) (Hymenoptera: Formicidae) . **Micron**. 36:449–460. 2005.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. Churchill Livingstone. 2:624p. 1985.
- PEETERS, C. & CREWE, R.M. Insemination controls the reproductive division of labour in a Ponerine ant. **Naturwissenschaften**. 71:50-51. 1984.
- QUENNEDEY, A. Insect epidermal gland cells: ultrastructure and morphogenesis. **Microscopy Anatomy of Invertebrates**. 11A:177-207. 1998.
- RIBEIRO, M. & CAETANO, F.H. **Cytochemistry for visualization of the Golgi complex in the in the intramandibular gland of old major workers of *Zacryptocerus pusillus* (Hymenoptera, Formicidae)**. ICEM 14 Cancun. 749-750p. 2000.
- ROMANI, R.; ISIDORO, N. & BIN, F. Male antennal glands in *Bombus pascorum* Sap: Morphology, possible function and comparison with Hymenoptera Aculeata. **Insect Sociaux Life**. 4:115-123. 2002.

- ROMANI, R.; ISIDORO, N.; RIOLO, P. & BIN, F. Antennal glands in male bees: Structures for sexual communication by pheromones? **Apidologie**. 34:603-610. 2003.
- ROMANI, R.; ISIDORO, N.; RIOLO, P.; BIN, F.; FORTUNATO, A. & BEONI, L. A new role for antennation in paper wasps (Hymenoptera, Vespidae): Antennal courtship and sex dimorphic glands in antennomeres. **Insectes Sociaux**. 52:96-102. 2005.
- ROUX, O.; BILLEN, J.; ORIVEL, J. & DEJEAN, A. An overlooked mandibular- rubbing behavior used during recruitment by the african weaver ant, *Oecophylla longinoda*. **PLoS ONE**. 5(2): e8957 doi: 10.1371/journal.pone.0008957.2010.
- SANTOS, C.G.; MEGIOLARO, F.; SERRÃO, J.E. & BLOCHTEIN, B. Morphology of the head salivary and intramandibular glands of the stingless bee *Plebeia emerina* (Friese) (Hymenoptera, Meliponini) workers associated with propolis. **Annals of the Entomological Society of America**. 102:137-143. 2009.
- SCHOETERS, E. & BILLEN, J. The intramandibular gland, a novel exocrine structure in ants (Insecta, Hymenoptera). **Zoomorphology**. 114:125-131. 1994.
- SCHULTZ, T.R. Ants, plants and antibiotics. **Nature**. 398 (29). 1999.
- SMITH, R.K.; SPIVAK, M.; TAYLOR, O.R.; BENNET, C. & SMITH, M.L. Maturation of tergal gland alkene profiles in European honey bee queens, *Apis mellifera* L. **Journal of Chemical Ecology**. 19:133-142. 1993.

- STEFANINI, M.; DEMARTINO, C. & ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature**. 216:173-174. 1967.
- TOLEDO, L.F.A. Histo-anatomia de glândulas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera). **Arquivo do Instituto Biológico**. 34:321-329. 1967.
- WILSON, E.O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae). I: The overall pattern in *A. sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. 7:143-56. 1980.
- WILSON, E.O. **The insect societies**. Cambridge, MA. Harvard Univ.Press. 1971.
- WOSSLER, T.C.; VEALE, R.M. & CREWE, R.M. How queen-like are the tergal glands in workers of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata*? **Apidologie**. 31:47-54. 2000.

## CAPÍTULO 3

### HIDROCARBONETOS E ESTERÓIS DAS GLÂNDULAS INTRAMANDIBULARES DE *Pachycondyla villosa* (FABRICIUS, 1804) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE, PONERINAE) E RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS

#### RESUMO

As formigas Ponerinae possuem características presumivelmente similares ao ancestral, com dimorfismo das castas feminina pouco desenvolvido, sendo as rainhas e as operárias parecidas e a comunicação química incipiente. Os diferentes comportamentos dos insetos sociais são geralmente modulados por secreções de diversas glândulas exócrinas. Dentre as glândulas exócrinas, as glândulas intramandibulares tem sua função pouco conhecida. O objetivo deste estudo foi de identificar os compostos químicos presentes no interior da mandíbula e na superfície do corpo de rainhas e operárias de *Pachycondyla villosa*, contribuindo para compreensão e elucidação da função das glândulas intramandibulares em sua comunicação. Foram realizados testes comportamentais com vídeo rastreamento em uma arena com extratos de mandíbula e análises em CG-MS das substâncias da superfície do corpo e da mandíbula de *P. villosa*. Os testes comportamentais mostraram resultados com diferença significativa ( $p= 0,024$ ) apenas quando avaliado o tempo de caminamento da formiga exposta ao extrato de mandíbula de suas companheiras de ninhos versus hexano. Sete compostos diferentes foram identificados em operárias e rainhas. Alcanos lineares C28 e C30 e o alcano metilado 18, 17,13-MeC38

foram encontrados no corpo e na mandíbula tanto em operárias quanto em rainhas, enquanto os alcanos metilados 4-MeC28 e 13, 11-MeC32 foram encontrados apenas no corpo de ambas as castas. Os esteróis precursores de hormônios, colesterol e sitosterol foram encontrados apenas em mandíbulas, sendo o primeiro em operárias e rainhas e o segundo apenas em rainhas. As análises comportamentais indicam que as substâncias das glândulas intramandibulares de *P. villosa* estão envolvidas no reconhecimento de companheiras de ninho, e a presença de hidrocarbonetos e os esteróis colesterol em operárias e o sitosterol encontrado na mandíbula de rainhas podem estar associados ao perfil da casta, sendo provável que o sitosterol encontrado apenas na mandíbula de rainha assuma o papel de um sinalizador de fertilidade, uma possível fonte de hormônio e/ou feromônio.

**HYDROCARBONS AND STEROLS FROM INTRAMANDIBULAR  
GLANDS OF *Pachycondyla villosa* (FABRICIUS, 1804) (HYMENOPTERA:  
FORMICIDAE, PONERINAE) AND BEHAVIORAL RESPONSES**

**ABSTRACT**

The Ponerinae ants have characteristics presumably similar to the ancestral with female caste dimorphism poorly developed; the queens and workers are similar and the chemical communication is incipient. The different behavior of social insects is usually modulated by secretion of various exocrine glands. Among the exocrine glands, the intramandibular glands have their function poorly known. The aim of this study was to identify the chemical compounds present inside the mandible and in the body surface of queens and workers of *Pachycondyla villosa*, contributing to the understanding the intramandibular gland functions in the communication. Behavioral tests were performed with the aid of video tracking in an arena containing extracts of the worker mandibles; and also GC-MS analyzes of substances of *P. villosa* body surface and mandible. Behavioral tests showed significant difference ( $p = 0.024$ ), with the increase of walking time of ants exposed to its nestmate mandible extract. Seven different compounds were identified in workers and queens. Linear alkanes C28 and C30 and the methylated alkane 18, 17,13-MeC38 were found in the body and mandible in both workers and queens, while the methylated alkanes 4-MeC28 e 13, 11-MeC32 were found only in the bodies of the two castes. The sterols precursors of hormones, cholesterol and sitosterol were found only in the mandibles, and the first substance was found in workers and queens and the second substance in queens only. The behavioral analyses indicate that substances found in

intramandibular glands of *P. villosa* are involved in the recognition of nest mates, and the presence of hydrocarbons and cholesterol sterol in workers and sitosterol found in queen's mandible may be associated with the castes profile. Probably, the sitosterol found only in the queen mandible plays role as an indicator of fertility, possible source of hormone or is a pheromone.

## 1. INTRODUÇÃO

As respostas comportamentais dos insetos estão intimamente relacionadas às variações quantitativas e qualitativas dos feromônios no meio em que vivem (Howard & Blomquist, 2005). Nos insetos sociais, grande parte dos estímulos químicos e suas consequentes respostas comportamentais ocorrem dentro da própria colônia, entre companheiros de ninho (Jackson & Morgan, 1993; Blomquist & Bagnères, 2010).

Comportamentos que requerem dispersão rápida dos sinais químicos, como os de defesa, podem envolver feromônios constituídos por moléculas pequenas e voláteis. Entretanto, os insetos sociais desenvolveram vários outros mecanismos de comunicação assim como feromônios desencadeadores e preparadores, nos quais estão envolvidos compostos relativamente não voláteis como os hidrocarbonetos (Blomquist & Bagnères, 2010). Segundo Wilson (1963), os hidrocarbonetos cuticulares atuam como feromônios preparadores que são os envolvidos em processos comportamentais de longo prazo e feromônios desencadeadores que são aqueles que provocam mudanças imediatas e reversíveis no comportamento de outro organismo.

Os hidrocarbonetos presentes na cutícula de formigas Ponerinae atuam em processos comportamentais como sinais de fertilidade e dominância da rainha (Le Conte & Hefetz, 2008), agindo como feromônios preparadores do comportamento (Vilela & Della Lucia, 2001), ou seja, sua produção durante a atividade ovariana de rainhas ou operárias férteis provoca a inibição do desenvolvimento ovariano de outras operárias (Monnin, 2006). Testes sobre a influência da presença da rainha no

desenvolvimento ovariano de formigas mostram que a inibição só ocorre quando as operárias estão próximas da rainha, ou seja, por meio de feromônios de contato como, por exemplo, os hidrocarbonetos cuticulares (Liebig et al., 2000). Além do efeito modulador, hidrocarbonetos cuticulares agem como feromônios desencadeadores em processos de reconhecimento de companheiras de ninho e de distinção de indivíduos intrusos (Breed, 1983; Singer et al., 1998; Blomquist et al., 1998; Nunes, 2008). Além disso, também são atribuídas a eles funções relacionadas à identificação dos indivíduos dentro da colônia, como por exemplo, a qual casta pertence, quais são os indivíduos geneticamente relacionados, qual a sua função na colônia e outras respostas comportamentais (Breed & Bennett, 1987, Jungnickel et al., 2004).

As formigas possuem grande diversidade de glândulas exócrinas especializadas, que secretam substâncias químicas de forma controlada. Essas glândulas variam na sua estrutura, composição química e fisiologia (Billen & Morgan, 1998; Caetano et al., 2002), as quais contribuem para o sucesso biológico destes insetos.

Diferente das glândulas mandibulares que são as mais estudadas e melhor conhecidas, especialmente no que se refere à composição química; pouco se conhece sobre as glândulas intramandibulares, e esse conhecimento se restringe a análises descritivas da morfologia (Nedel, 1960; Toledo, 1967; Costa-Leonardo, 1978; Schoeters & Billen, 1994; Ribeiro & Caetano, 2000; Billen & Espadaler, 2002; Cruz-Landim & Abdalla, 2002; Grasso et al., 2004; Santos, et al. 2009; Roux et al., 2010; Cruz-Landim et al., 2011; Martins & Serrão, 2011). A glândula intramandibular foi descrita

pela primeira vez em abelha por Nedel (1960) e na formiga *Atta sexdens rubropilosa* por Toledo (1967) e até a presente data não se conhecem os componentes químicos produzidos por essas glândulas. Sendo assim, estudos dessas glândulas intramandibulares devem ser conduzidos para determinar os componentes químicos e relacioná-los a uma possível função destas glândulas até então desconhecidas.

Ao contrário de Myrmicinae que possuem características derivadas, Ponerinae possuem características presumivelmente similares ao ancestral (Wheeler, 1910; Kusnezov, 1955), tais como: dimorfismo das castas femininas pouco desenvolvido, sendo as rainhas e as operárias parecidas, comunicação química incipiente e pouca cooperação entre as operárias (Wilson, 1963; 1971; Peeters & Crewe, 1984). Essas características chamaram atenção para o desenvolvimento deste trabalho, utilizando *P. villosa* como instrumento de estudo de comunicação social, uma vez que a diversificação dentre os Ponerinae não a tornou muito distante morfológicamente de seu ancestral, pois ela parece tão antiga quanto os outros grupos de formigas já extintos (Grimaldi et al., 1997). O conhecimento de características fisiológicas, morfológicas e químicas do sistema exócrino das formigas é importante para a compreensão de aspectos comportamentais e evolutivos desses insetos.

Durante o processo evolutivo, os hidrocarbonetos cuticulares foram sendo cada vez mais empregados para a comunicação, principalmente, entre os insetos sociais (Le Conte & Hefetz, 2008). O conhecimento sobre as características dos compostos químicos em especial hidrocarbonetos cuticulares envolvidos na comunicação das formigas vêm crescendo nos

últimos anos graças às descobertas de novas técnicas de extração e análise químicas.

Operárias de *P. villosa* apresentam glândulas intramandibulares da classe I, caracterizadas como células epidérmicas colunares e glândulas unicelulares da classe III (Martins & Serrão, 2011), segundo a classificação de Noirot & Quennedey (1974,1991).

O objetivo deste estudo foi de identificar os compostos químicos presentes no interior da mandíbula, contribuindo para compreensão e elucidação da função das glândulas intramandibulares na comunicação de *P. villosa*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Formigas**

Cinco colônias de *P. villosa* foram coletadas no campo experimental do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPLAC) em Ilhéus, Bahia, Brasil e criadas em laboratório em ninhos artificiais, pelo menos, três meses antes de serem analisadas. O ninhos foram mantidos a  $25 \pm 4$  °C, com cerca de 50 - 80% de umidade relativa. Todos as colônias foram tratadas com uma dieta idêntica (mistura de mel e maçã e larvas de *Tenebrio molitor* L.) *ad libitum*, fornecidas duas vezes semanais. Rainha e operárias foram retiradas diretamente das colônias.

Além de *P. villosa*, colônias de *P. verenae* obtidas por coletas manuais no campo de fruticultura da Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais – Brasil, foram utilizadas para obtenção de extratos das glândulas intramandibulares, para os bioensaiois comportamentais.

## **2.2. Bioensaios comportamentais**

### **2.2.1. Vídeo rastreamento**

Vídeo rastreamento é um sistema formado por uma câmera de vídeo acoplada a um computador que avalia as seguintes características de um inseto em uma arena experimental: distância percorrida, tempo em movimento, velocidade média de caminhar e número de paradas. Este estudo foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

A extração dos compostos glandulares do interior da mandíbula ocorreu pela maceração de 25 a 30 pares de mandíbulas de operárias de *P. villosa* em solvente apolar hexano (500 µL) por 10 minutos.

Arenas foram confeccionadas em vasilhame plástico com 17 cm de diâmetro e 4 cm de altura. O fundo das arenas foi recoberto com uma base de gesso e por cima desses foi colocado um disco de papel-filtro. As paredes internas do vasilhame foram revestidas com teflon e cobertas com um filme plástico para evitar o escape da formiga.

Os testes comportamentais foram realizados em sala com iluminação artificial, a  $25 \pm 3$  °C, das 9 às 18 horas. Os testes foram realizados aplicando-se 30 µL do extrato das mandíbulas e 30 µL de hexano como controle (ver tratamentos) em pedaços de papel filtro de 2cm x 2cm, em seguida esses pedaços de papel foram colocados em lados opostos da arena. Uma formiga foi colocada no centro da arena, entre os dois papéis de filtro. A cada repetição, o papel-filtro que recobre a arena e os que continham os tratamentos foram trocados para evitar possíveis odores liberados pela formiga anteriormente analisada.

Os tratamentos foram os seguintes: T1 - papel filtro sem extrato ou hexano; T2 - papel filtro com hexano; T3 - papel filtro com extrato de mandíbula de outra espécie (*Pachycondyla verenae*) X hexano; T4 - papel filtro com extrato de mandíbula de *P. villosa* de colônia diferente X hexano; T5 - papel filtro com extrato da mandíbula de *P. villosa* da mesma colônia X hexano; T6 – papel filtro com extrato de *P. villosa* de colônia diferente X extrato de *P. verenae*; T7 - papel filtro com extrato de *P. villosa* da mesma colônia X extrato de *P. villosa* de colônia diferente.

Para cada tratamento foram realizadas 20 repetições sendo o movimento de cada formiga registrado durante 10 minutos na arena e digitalmente transferidos para o computador usando o sistema ViewPoint de monitoramento automatizado (ViewPoint Life Sciences Inc., Montreal – Canadá). As imagens do vídeo da arena foram divididas em duas zonas simétricas, uma controle, tratada apenas com hexano puro e a outra com o extrato glandular da mandíbula (tratamentos de 1 a 5). Nos tratamentos 6 e 7, os extratos foram colocados em lados opostos da arena. Para cada tratamento, foram avaliados o tempo de caminhada, tempo parado, distância percorrida e velocidade do caminhada.

### **2.2.2. Análises estatísticas**

Os resultados para o bioensaio comportamental de caminhada foram submetidos a testes de normalidade e de homogeneidade de variância seguindo-se comparação pelo teste *t*-student com 5% de probabilidade.

## **2.3. Cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-MS)**

### **2.3.1. Extração de hidrocarbonetos cuticulares e intramandibulares**

Para a extração e caracterização do perfil químico cuticular e intramandibular de rainha e operárias, foram utilizadas indivíduos de três colônias. Para casta de rainha foram utilizados quatro indivíduos fisogástricos, enquanto para a casta operária, foram utilizados três indivíduos de cada colônia. Cada indivíduo foi retirado da colônia usando pinças limpas e colocado em frascos previamente lavados com hexano.

Para análises dos hidrocarbonetos foi utilizado o método com fibras de polidimetilsiloxano para caracterização de hidrocarbonetos e outros compostos químicos. Todas as amostras do perfil químico de rainhas fisogástricas e operárias foram obtidas através da técnica não - destrutiva de micro - extração em fase sólida (SPME), de modo que elas permanecem ativas no ninho após a coleta das amostras. A extração de hidrocarbonetos ocorreu por meio do contato e leve fricção de fibra de polidimetilsiloxano SUPELCO (30  $\mu\text{m}$ ) por cerca de 4 segundos em diferentes partes do corpo da formiga, cabeça, tórax e abdômen, evitando as áreas que liberam substâncias de outras glândulas, e as pernas devido à contaminação. As mandíbulas foram retiradas do corpo e macerada em placa de vidro com auxílio de um bastão de vidro (todos os materiais utilizados foram lavados com detergente extran, higienizados em álcool e dois banhos de hexano), a extração das substâncias intramandibulares também foi realizada por meio de leve fricção de fibra no macerado por cerca de 10 segundos. As fibras foram imediatamente injetadas manualmente em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa.

### **2.3.2. Análise de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-MS)**

As análises das amostras das fibras de polidimetilsiloxano foram realizadas no Laboratório de Comportamento e Ecologia de Insetos Sociais de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – FFCLRP/USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. As amostras foram analisadas em CG-MS (Shimadzu, modelo QP2010 plus) equipado com coluna capilar de sílica DB - 5MS de 30 m e hélio como gás de arraste a 1 mL/min.

O protocolo de temperatura do forno usado foi inicialmente definido para 150 °C, elevando-se 10 °C/min até 280 °C. As análises foram realizadas em modo *splitless*. Os dados foram analisados por caracterização do espectro de massa. Comprimentos de cadeia equivalente foram determinados utilizando n-alcenos padrões (Sigma Chemical Co.) e a quantificação foi baseada em áreas dos picos obtidas a partir dos cromatogramas.

Os dados obtidos foram analisados com o programa de computador GC-MS solutions versão Windows (Shimadzu Corporation) e os compostos químicos foram identificados com base em seus espectros de massa em comparação com os dados da biblioteca Wiley e com solução padrão de diferentes hidrocarbonetos sintéticos.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Bioensaios comportamentais**

O comportamento de caminhamento de *P. villosa* em arenas impregnadas com extratos glandulares da mandíbula estão mostradas na

Figura 1. Dentro dos tratamentos realizados, não houve diferenças ( $p < 0.05$ ) para o tempo parado, distância percorrida e velocidade de caminhada (Tabela 1). Para o parâmetro tempo de caminhada, o tratamento T4 (extrato da mandíbula de *P. villosa* da mesma colônia X hexano) foi diferente ( $p = 0,024$ ), sendo observado que as formigas caminharam durante  $293,9 \pm 38,4$  segundos, na superfície com extrato, contra  $253,7 \pm 65,9$  segundos na superfície com hexano (Figura 1E, Tabela 1), enquanto nos demais tratamentos não foram encontradas diferenças.

### 3.2. Análises químicas

As análises em CG-MS dos extratos do corpo e da mandíbula, obtidos por SPME mostraram a presença de sete compostos em operárias e rainhas de *P. villosa* (Tabela 2).

Alcanos lineares C28 e C30 e o alcano metilado 18, 17,13-MeC38 foram encontrados no corpo e na mandíbula tanto em operárias quanto em rainhas, enquanto os alcanos metilados 4-MeC28 e 13, 11-MeC32 foram encontrados apenas no corpo de ambas as castas (Figura 2, Tabela 2).

Os esteróis precursores de hormônios, colesterol e sitosterol foram encontrados apenas em mandíbulas, sendo o primeiro em operárias e rainhas e o segundo apenas em rainhas (Figura 2, Tabela 2).

## 4. DISCUSSÃO

A única resposta comportamental das operárias de *P. villosa* expostas aos extratos das glândulas intramandibulares, foi encontrada no tempo caminhado quando se comparou o extrato da mandíbula de formiga da

mesma colônia em relação ao solvente, sugerindo que os compostos extraídos da mandíbula apresentam hidrocarbonetos cuticulares que agem como feromônios desencadeadores em processos de reconhecimento de companheiras de ninho e de distinção de indivíduos intrusos (Breed, 1983; Singer et al., 1998; Blomquist et al., 1998; Nunes, 2008; Blomquist & Bagnères, 2010; Martin & Drijfhout, 2009; Wilgenburg, et al. 2011).

Os alcanos lineares e ramificados encontrados no corpo e mandíbula de *P. villosa*, apresentam entre 28 e 38 carbonos sendo considerados compostos de cadeia longa, similarmente aos encontrados em extratos de hidrocarbonetos cuticulares em outros insetos sociais como cupins (Weil, et al., 2009), abelhas (Abdalla, et al., 2003, Dani, et al., 2005), vespas (Panek, et al., 2001) e formigas (D'Etorre, et al., 2004; Martin & Drijfhout, 2009; Wilgenburg, et al. 2011), os quais têm sido considerados como tendo papel importante no reconhecimento de companheiros de ninhos. Hidrocarbonetos cuticulares de cadeia longa semelhantes aos encontrados neste estudo foram encontrados na cutícula e na glândula pós-faríngea de *P. villosa* (Lucas et al., 2004), tendo sido atribuído a eles uma importante função no reconhecimento de companheiras de ninho, e na glandula Dufour de rainhas em *Melipona bicolor* (Abdalla et al., 2004), sugerindo que as diferenças entre o perfil cuticular das rainhas virgens e fecundadas deve indicar o estado de fecundidade.

Os alcanos metilados 4-MeC28 e 13, 11-MeC32 não ocorreram na mandíbula de operária nem de rainhas. Entretanto, os alcanos identificados, em conjunto com a resposta comportamental de *P. villosa* aos extratos de mandíbula de operárias do mesmo ninho sugerem que alguns dos

compostos produzidos pelas glândulas intramandibulares estejam relacionados com o reconhecimento dos companheiros de ninhos ou membros de diferentes castas. Embora hidrocarbonetos de cadeia longa sejam relativamente não voláteis (Blomquist & Bagnères, 2010), a ação destes como feromônios desencadeadores pode ocorrer por contato entre os indivíduos das colônias, pois formigas frequentemente apresentam contatos físicos como higienização, “allo-grooming” e trofalaxia (Hefetz, 2007).

Além de participarem no reconhecimento de companheiras de ninhos, os hidrocarbonetos cuticulares também podem ter função na regulação da reprodução em formigas (Peeters et al., 1999; Liebig et al., 2000), entretanto como em *P. villosa* não foram encontrados hidrocarbonetos cuticulares exclusivos de rainhas, esta parece não ser uma função dos compostos produzidos pela glândulas intramandibulares.

Um resultado interessante foi a presença dos esteróis colesterol e sitosterol apenas na mandíbula. Esteróides foram encontrados na cutícula das formigas parabióticas, *Crematogaster modiglianii* e *Camponotus rufifemur* bem como na glândula de Dufour, sugerindo que esses compostos são produzidos nesta glândula e depois distribuídos para a superfície do corpo, ocorrendo transferência mútua de substância entre os indivíduos, proporcionando uma assinatura semelhante (Menzel et al., 2008). Diferente dos resultados encontrados em *C. modiglianii* e *C. rufifemur* (Menzel et al., 2008), no presente estudo as substâncias intramandibulares, colesterol e sitosterol não foram transferidas para o corpo de *P. villosa*, indicando que o sitosterol e colesterol encontrados nas mandíbulas não estão diretamente envolvidos na produção de assinaturas cuticulares. No entanto, o sitosterol

pode estar envolvido no reconhecimento da rainha fisogástrica onde ocorre com exclusividade. Amadou et al. (1995) identificaram 26 esteróides a partir de ovos, larvas, operárias e rainhas de *Solenopsis invicta*, entre eles colesterol e sitosterol, sendo que as rainhas possuíam a composição de esteróis mais variada com 24 esteróis detectados dos quais o sitosterol apresentou maior concentração. Porém, a função destes esteróis permanece desconhecida.

A presença de hidrocarbonetos e colesterol em operárias e o sitosterol encontrado na mandíbula de rainhas pode estar associados ao perfil da casta e conseqüentemente a divisão de trabalho, em especial, no que diz respeito à rainha que é a casta reprodutiva e dominante. De acordo com Nascimento et al., (1993), Hernández et al., (1999), Hughes et al., (2001), Cruz-Landim & Abdalla (2002), a composição dos feromônios ou das substâncias químicas, pode variar entre as castas de formigas. A variabilidade intracolônia em perfis de hidrocarbonetos cuticulares tem sido mostrada previamente por estar associada com diferenças nas tarefas desempenhadas pelas operárias (Bonavita-Cougourdan et al., 1987; Bonavita-Cougourdan et al., 1993); e no estado reprodutivo (Peeters et al., 1999; Liebig et al., 2000; Cuvillier-Hot et al., 2001; D'Etorre, et al., 2004; Lommelen et al., 2006). O esterol sitosterol, ocorre apenas nas mandíbulas de rainha de *P. villosa*, sugerindo que as glândulas intramandibulares de rainhas e operárias desta formiga apresentam variação funcional de acordo com a casta. Variações morfo-fisiológicas das glândulas intramandibulares em diferentes castas foram recentemente descritas na abelha *Melipona*

*quadrifasciata* (Cruz-Landim et al., 2011), embora o significado disto permaneça desconhecido.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o perfil de hidrocarbonetos cuticulares e de substâncias das glândulas intramandibulares em rainhas e operárias de *P. villosa* diferem na composição dos esteróis, sendo provável que o sitosterol encontrado apenas na mandíbula de rainha assumo o papel de um sinalizador de fertilidade, uma possível fonte de hormônio e/ou feromônio.

## **AGRADECIMENTOS**

A FAPEMIG pela concessão da bolsa, e pelo suporte das agências de pesquisas brasileiras CNPq e SECTI/FAPESB-CNPq-PNX0011/2009. Ao Prof. Jacques H. C. Delabie pela identificação das formigas e infraestrutura, ao Sr. José Raimundo Maia e ao Sr. José Adade pelo auxílio nas coletas, ambos do Laboratório de Mirmecologia do Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC) Ilhéus, Bahia, Brasil. Ao Prof. Eraldo Lima do Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil, pela disponibilidade e sugestões para o desenvolvimento da metodologia e análises químicas. Ao Prof. Raul Narciso C. Guedes permissão do uso do equipamento de vídeo rastreamento, ao MSc Hipólito A. E. Malia pela ajuda na utilização do equipamento de vídeo rastreamento e análise estatística, ambos do Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Ao Prof. Fabio S. Nascimento pela disponibilidade e concessão do uso do GC-MS, e a MSc Maria Cláudia G. Campos por sua ajuda nas análises químicas, ambos do Lab. de Comportamento e Ecologia de Insetos Sociais, da Universidade de São Paulo FFCLRP/USP-Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

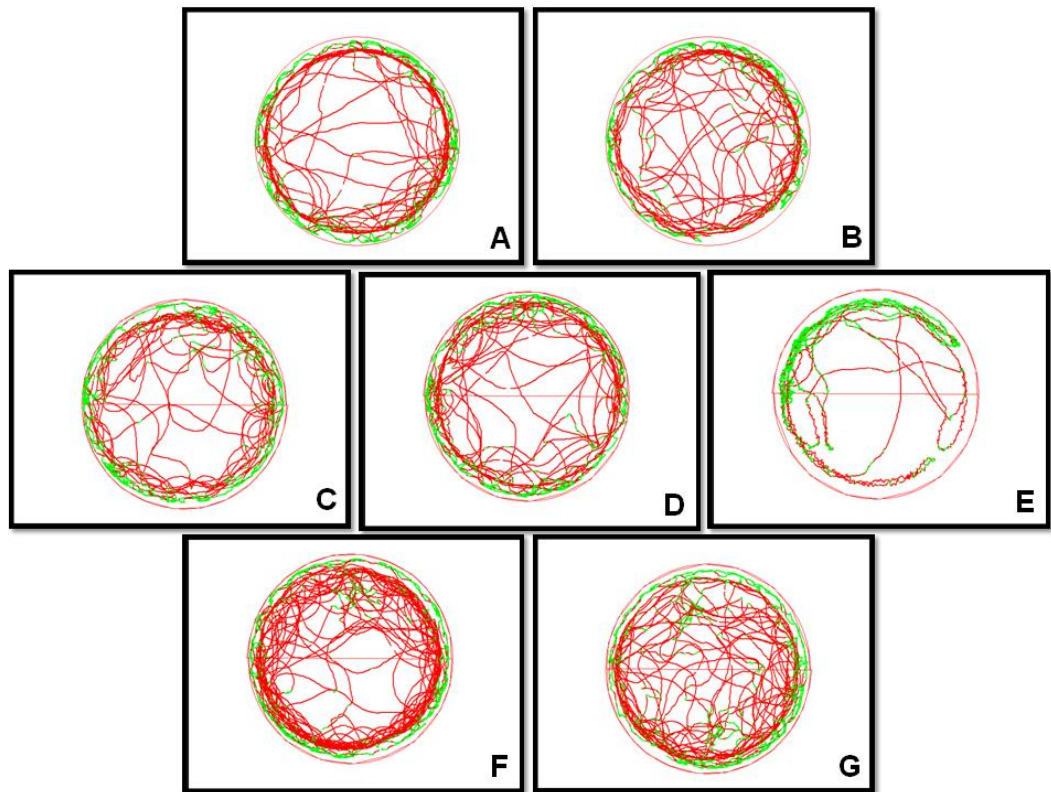


Figura 1. Avaliação comportamental de *P. villosa* mediante a extratos intramandibulares. As substâncias foram distribuídas para os tratamentos T3 a T7 da mesma forma apresentadas nas figuras: face superior X face inferior respectivamente. A. T1 - papel filtro sem extrato ou solvente. B. T2 - papel filtro com hexano. C. T3 - papel filtro com extrato de mandíbula de outra espécie (*Pachycondyla verenae*) X hexano. D. T4 - papel filtro com extrato de mandíbula de *P. villosa* de colônia diferente X hexano. E. T5 - papel filtro com extrato da mandíbula de *P. villosa* da mesma colônia X hexano. F. T6 – papel filtro com extrato de *P. villosa* de colônia diferente X extrato de *P. verenae*. G. T7 - papel filtro com extrato de *P. villosa* da mesma colônia X extrato de *P. villosa* de colônia diferente. As linhas coloridas correspondem a velocidade do caminhamento da formiga na arena, sendo que a verde corresponde a uma velocidade lenta até a parada e a vermelha uma velocidade maior.

Tabela 1. Análises do caminhamento de *Pachycondyla villosa* em diferentes tratamentos contendo extratos de mandíbula. A avaliação do tempo foi dada em segundos, a distância em centímetros e a velocidade em centímetros/segundos. Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros em ambos os lados das arenas, seguidos dos valores  $p$  obtidos pelo teste  $t$  a 5% de significância.

Tratamentos	Hexano X Controle	Hexano X Mesma colônia	Hexano X Mesma espécie	Hexano X Espécie diferente	Mesma colônia X Colônia diferente	Espécie diferente X Mesma espécie
	Média $\pm$ Desvio Padrão					
Tempo caminhado	572,25 $\pm$ 14,32	253,69 $\pm$ 65,89	257,52 $\pm$ 61,58	277,15 $\pm$ 49,76	290,97 $\pm$ 81,37	296,51 $\pm$ 72,15
	574,88 $\pm$ 16,86 $p=0,508$	293,88 $\pm$ 38,34 $p=0,024$	290,94 $\pm$ 77,72 $p=0,140$	279,53 $\pm$ 41,04 $p=0,870$	270,92 $\pm$ 93,77 $p=0,425$	263,95 $\pm$ 67,25 $p=0,148$
Tempo parado	27,700 $\pm$ 14,316	10,45 $\pm$ 5,05	16,65 $\pm$ 26,04	16,14 $\pm$ 11,21	29,50 $\pm$ 42,54	14,96 $\pm$ 22,12
	22,590 $\pm$ 14,462 $p=0,268$	37,83 $\pm$ 60,48 $p=0,433$	14,41 $\pm$ 18,26 $p=0,579$	25,47 $\pm$ 41,58 $p=0,787$	7,78 $\pm$ 7,26 $p=0,133$	14,30 $\pm$ 16,89 $p=0,534$
Distância percorrida	1290,59 $\pm$ 411,76	565,79 $\pm$ 221,36	596,84 $\pm$ 308,74	518,51 $\pm$ 133,90	639,33 $\pm$ 181,73	686,72 $\pm$ 366,22
	1121,92 $\pm$ 270,61 $p=0,208$	616,72 $\pm$ 253,34 $p=0,675$	610,05 $\pm$ 190,41 $p=0,172$	522,77 $\pm$ 158,92 $p=0,882$	646,98 $\pm$ 250,21 $p=0,912$	567,81 $\pm$ 164,42 $p=0,508$
Velocidade percorrida	2,24 $\pm$ 0,67	2,20 $\pm$ 0,72	2,33 $\pm$ 0,82	1,93 $\pm$ 0,61	2,31 $\pm$ 0,67	2,27 $\pm$ 0,70
	1,95 $\pm$ 0,44 $p=0,190$	2,08 $\pm$ 0,72 $p=0,839$	2,11 $\pm$ 0,63 $p=0,229$	1,86 $\pm$ 0,43 $p=0,989$	2,65 $\pm$ 1,26 $p=0,579$	2,23 $\pm$ 0,70 $p=0,409$

Tabela 2. Substâncias químicas das glândulas intramandibulares (M) e do corpo (C) de operárias (n=9) e rainhas (n=4) de *Pachycondyla villosa*.

Tempo de Retenção (min.)	Composto	Íon Diagnóstico	Operária		Rainha	
			M	C	M	C
38.643	C <sub>28</sub>	394	+	+	+	+
39.207	4-Me C <sub>28</sub>	57/58, 364/365, 393		+		+
40.531	C <sub>30</sub>	422	+	+	+	+
41.539	Colesterol	386	+		+	
41.962	13-, 11- Me C <sub>32</sub>	196/197, 295; 168/169, 323; 449		+		+
45.910	Sitosterol	414			+	
58.363	18-, 17, 13- Me C <sub>38</sub>	266/267, 308/309; 252/253, 322/323; 378/379, 196/197-533	+	+	+	+

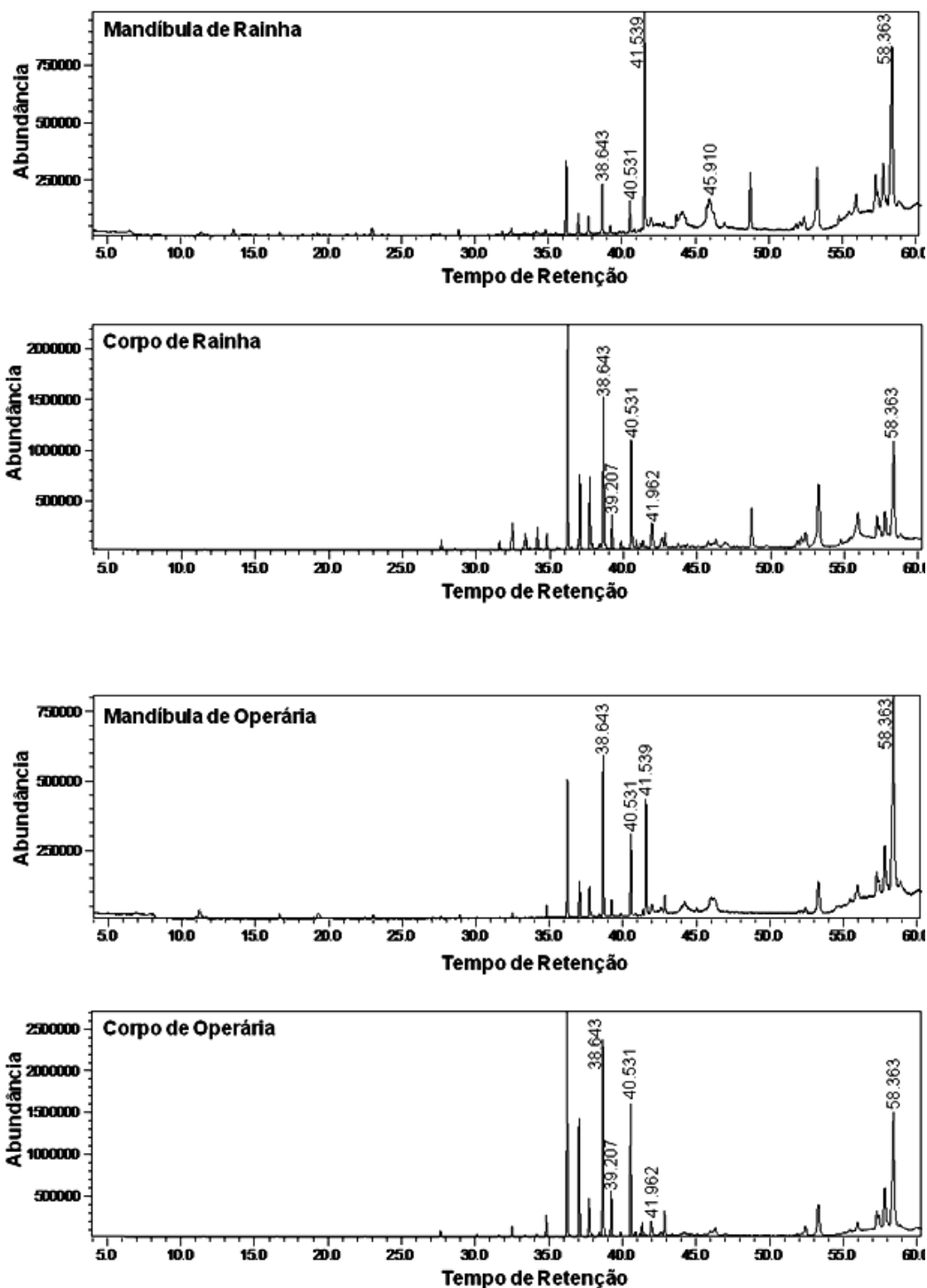


Figura 2. Cromatogramas das substâncias químicas encontradas na mandíbula e no corpo de rainhas e operárias de *Pachycondyla villosa* e seus respectivos tempos de retenção. Tempos de retenção (Tr): Tr. 38.643= C<sub>28</sub>; Tr. 39.207= 4-Me C<sub>28</sub>; Tr. 40.531= C<sub>30</sub>; Tr. 41.539 = colesterol; Tr. 41.962= 13-, 11- Me C<sub>32</sub>; Tr. 45.910 = sitosterol; Tr. 58.363 =18-, 17, 13- Me C<sub>38</sub>.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, F.C.; JONES, G.R.; MORGAN, E.D. & CRUZ-LANDIM, C. Chemical composition of the Dufour gland secretion in queens of *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Meliponini). **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 15: 621-625. 2004.
- ABDALLA, F.C.; JONES, G.R.; MORGAN, E.D. & CRUZ-LANDIM, C. Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. **Genetics and Molecular Research**. 2: 191-199. 2003.
- AMADOU, S. BA; DE-AN GUO; ROBERT A. NORTON; SHERMAN A. PHILLIPS JR. & W. DAVID NES. Developmental Differences in the Sterol Composition of *Solenopsis invicta*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. 29:1-9. 1995.
- BILLEN, J. & ESPADALER, X. A novel epithelial intramandibular gland in the ant *Pyramica membranifera* (Hymenoptera, Formicidae). **Belgian Journal of Zoology**. 132: 175-176. 2002.
- BILLEN, J. & MORGAN, E.D. Pheromone communication in social insects – sources and secretions. In: VANDER MEER, R.K, BREED, M.D, ESPELIE, K.E, WINSTON, M.L (EDS) **Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites**. Westview, Boulder, Colo, pp. 3-33. 1998.
- BLOMQUIST G.J. & BAGNÈRES A.G. **Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology**. Cambridge: Cambridge University Press. 528 p. 2010.

- BLOMQUIST, G. J.; TILLMAN, J. A.; MPURU, S. & SEYBOLD S. J. The cuticle and cuticular hydrocarbons of insects: structure, function, and biochemistry. In: Pheromone communication in social insect (Vander Meer RK, Breed MD, Winston ML and Espelie KE, eds.). **Westview Press**. Boulder, 35 - 54. 1998.
- BONAVITA-COUGOURDAN, A.; CLEMENT, J.L. & LANGE, C. Functional subcaste discrimination (foragers and brood-tenders) in the ant *Camponotus vagus* Scop: polymorphism of cuticular hydrocarbon patterns. **Journal of Chemical Ecology**. v.9, n.7, p.1461-1477, 1993
- BONAVITA-COUGOURDAN, A. & CLEMENT, J.L.; LANGE, C. Nestmate recognition: The role of cuticular hydrocarbons in the ant *Camponotus vagus* Scop. **Journal of Entomological Science**. 22: 1-10. 1987.
- BREED, M.D. & BENNETT, B. **Kin recognition in highly eusocial insects**. In: Fletcher, D.J.C. & Michener, C.D. (eds.), Kin recognition in animals, John Wiley & Sons, Chichester, 243-285p. 1987.
- BREED, M.D. Nestmate recognition in honeybees. **Animal Behaviour**. 31: 86-91. 1983.
- CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K. & ZARA, F.J. **Formigas: biologia e anatomia**. Rio Claro: F.H.C., 42p. 2002.
- COSTA-LEONARDO, A.M. Glândulas intramandibulares em abelhas sociais. **Ciência e Cultura**. 30:835-838. 1978.
- CRUZ-LANDIM, C. & ABDALLA, F.C. **Glândulas exócrinas das abelhas**. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 181 p. 2002.
- CRUZ-LANDIM, C.; GRACIOLI-VITTI, L.F. & ABDALLA, F.C. Ultrastructure of the intramandibular gland of workers and queens of the stingless

- bee, *Melipona quadrifasciata* (Meliponini). **Journal of Insect Science**. 11:1-9. 2011.
- CUVILLIER - HOT, V.V.; COBB, M; MALOSSE, C. & PEETERS, C. Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. **Journal of Insect Physiology**. 47: 485-493. 2001.
- D'ETTORRE, P.; HEINZE, J.; SCHULZ, C.; FRANCKE, W. & AYASSE, M. Does she smell like a queen? Chemoreception of a cuticular hydrocarbons signal in the ant *Pachycondyla inversa*. **The Journal of Experimental Biology**. 207: 1085-1091. 2004.
- DANI, F.R.; JONES, G.R.; CORSI, S.; BEARD, R.; PRADELLA, D. & TURILLAZZI, S. Nestmate Recognition Cues in the Honey Bee: Differential Importance of Cuticular Alkanes and Alkenes. **Chemical Senses**. 30: 477–489. 2005.
- GRASSO, D.A.; ROMANI, R.; CASTRACANI, C.; VISICCHIO, R.; MORI, A., ISIDORO, N. & LE MOLI, F. Mandible associated glands in queens of the slave-making ant *Polyergus rufescens* (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux**. 51:74-80. 2004.
- GRIMALDI, D.; AGOSTI, D. & CARPENTER, J.M. New and rediscovered primitive ants (Hymenoptera, Formicidae) in Cretaceous amber from New Jersey, and their phylogenetic relationships. **American Museum Novitates**. 3208:1-43. 1997.
- HEFETZ, A. The evolution of hydrocarbon pheromone parsimony in ants (Hymenoptera: Formicidae) – interplay of colony odor uniformity and odor idiosyncrasy. **Myrmecological News**. 10:59-68. 2007

- HERNÁNDEZ, J. V.; CABRERA, A. & JAFFÉ, K. Mandibular gland secretion in different caste of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*. **Journal of Chemical Ecology**. 25:2433-2444. 1999.
- HOWARD, R.W. & BLOMQUIST, G.J. Ecological, behavioural, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. **Annual Review of Entomology**. 50: 371-393. 2005.
- HUGHES, W.O.H., HOWSE, P.E. & GOULSON, D. Mandibular gland chemistry of grass-cutting ants: species, caste, and colony variation. **Journal of Chemical Ecology**. 27:109-124. 2001.
- JACKSON, B.D & MORGAN, E.D. Insect chemical communication: Pheromones and exocrine glands of ants. **Chemoecology**. 4:125-144. 1993.
- JUNGNICKEL, H.; DA COSTA A.J.S.; TENTSCHERT, J.; PATRÍCIO, E.F.L.R.A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; DRIJFHOUT, F.; MORGAN, E.D. Chemical basis for inter - colonial aggression in the stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Insect Physiology**. 50: 761-766. 2004.
- KUSNEZOV, N. Evolución de las hormigas. **Dusenía**. 6:1-34. 1955.
- LE CONTE, Y.; HEFETZ, A. Primer pheromones in social hymenoptera. **Annual Review of Entomology**. 53: 523 – 542. 2008.
- LIEBIG, J.; PEETERS, C.; OLDHAM, N.J.; MARKSTADTER. C. & HÖLLDOBLER, B. Are variations in the cuticular hydrocarbons of queens and workers a reliable signal of fertility in the ant *Harpegnathos saltator*? **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 97: 4124-4131. 2000.

- LOMMELEN, E.; JOHNSON, C.A.; DRIJFHOUT, F.P.; BILLEN, J. & WENSELEERS, T.; GOBIN, B. Cuticular hydrocarbons provide reliable cues of fertility in the ant *Gnamptogenys striatula*. **Journal of Chemical Ecology**. 32: 2023–2034. 2006.
- LUCAS, C.; PHO, D.B.; FRESNEAU, D. & JALLON J.M. Hydrocarbon circulation and colonial signature in *Pachycondyla villosa*. **Journal of Insect Physiology**. 50: 595-607. 2004.
- MARTIN, S. & DRIJFHOUT, F. A Review of Ant Cuticular Hydrocarbons. **Journal of Chemical Ecology**. 35:1151–1161. 2009.
- MARTINS, L.C.B. & SERRÃO, J.E. Morphology and histochemistry of the intramandibular glands in Attini and Ponerini (Hymenoptera, Formicidae) species. **Microscopy Research and Technique**. 74:763-771. 2011.
- MENZEL, F.; BLÜTHGEN, N.; SCHMITT, T. Tropical parabiogenic ants: Highly unusual cuticular substances and low interspecific discrimination. **Frontiers in Zoology**. 5:1-16. 2008.
- MONNIN, T. Chemical recognition of reproductive status in social insects. **Annales Zoologici Fennici**. 43: 515-530. 2006.
- NASCIMENTO, R., MORGAN, E.D., BILLEN, J., SCHOETERS, E., DELLALUCIA, T.M.C. & BENTO, J.M. Variation with the caste of the mandibular gland secretion in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Journal of Chemical Ecology**. 19:907-918. 1993.
- NEDEL, O.J. Morphologie und physiologie der mandibeldrüse einiger bienenarten (Apidae). **Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere**. 49:139-83. 1960.

- NOIROT, C. & QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. **Annual Review of Entomology**. 19:61-80. 1974.
- NOIROT, C. & QUENNEDEY, A. Glands, gland cells, glandular units: Some comments on terminology and classification. **Annales de la Société Entomologique de France**. 27:123-128. 1991.
- NUNES, T.M. **Reconhecimento parental em abelhas eussociais Neotropicais (Hymenoptera: Apinae, Meliponini): uma análise dos mediadores químicos e seus determinantes em *Frieseomelitta varia***. Dissertação de Mestrado em Entomologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. 2008.
- PANEK, L.M.; GAMBOA, G.J. & ESPELIE, K.E. The effect of a wasp's age on its cuticular hydrocarbon profile and its tolerance by nestmate and non-nestmate conspecifics (*Polistes fuscatus*, Hymenoptera: Vespidae). **Ethology**. 107:55-63. 2001.
- PEETERS, C., MONNIN, T. & MALOSSE, C. Cuticular hydrocarbons correlated with reproductive status in a queenless ant. **Proceedings of the Royal Society of London**. B 266: 1323-1327. 1999.
- PEETERS, C. & CREWE, R.M. Insemination controls the reproductive division of labour in a Ponerine ant. **Naturwissenschaften**. 71:50-51. 1984.
- RIBEIRO, M. & CAETANO, F.H. **Cytochemistry for visualization of the Golgi complex in the intramandibular gland of old major workers of *Zacryptocerus pusillus* (Hymenoptera, Formicidae)**. *ICEM 14 Cancun*. 749-750p. 2000.

- ROUX O, BILLEN J, ORIVEL J, DEJEAN A. An overlooked mandibular-rubbing behavior used during recruitment by the african weaver ant, *Oecophylla longinoda*. **PLoS one**. 5(2): e8957 doi: 10.1371/journal.pone.0008957.2010.
- SANTOS, C.G.; MEGIOLARO, F.; SERRÃO, J.E. & BLOCHTOIN, B. Morphology of the head salivary and intramandibular glands of the stingless bee *Plebeia emerina* (Friese) (Hymenoptera, Meliponini) workers associated with propolis. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 102, p. 137-143, 2009.
- SCHOETERS, E. & BILLEN, J. The intramandibular gland, a novel exocrine structure in ants (Insecta, Hymenoptera). **Zoomorphology**. 114:125-131. 1994.
- SINGER, T.L.; ESPELIE, K.E. & GAMBOA, G.J. Nest and nestmate discrimination in independent - founding wasps. In: Vander Meer, R.K.; Breed, M.D.; Winston; M.L.; Espelie, E.K. (eds.), **Pheromone communication in social insects**. Westview, Boulder, p.57 – 78. 1998
- TOLEDO, L.F.A. Histo-anatomia de glândulas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera). **Arquivos do Instituto Biológico**. 34:321-329. 1967.
- WEIL, T.; HOFFMANN, K.; KROISS J.; STROHM, E. KORB, J. Scent of a queen-cuticular hydrocarbons specific for female reproductives in lower termites. **Naturwissenschaften**. 96:315–319. 2009.
- WHEELER, W.M. **Ants: their structure, development and behavior**. Columbia University Press, New York. 663 p. 1910.

WILGENBURG, E.V.; SYMONDS, M.R.E. & ELGAR, M.A. Evolution of cuticular hydrocarbon diversity in ants. **Journal of Evolutionary Biology**. 24: 1188–1198. 2011.

WILSON, E.O. **The insect societies**. Cambridge, MA. Harvard Univ.Press. 1971.

WILSON, E.O. The social biology of ants. **Annual Review of Entomology**. 8:345-68. 1963.

## CONCLUSÕES FINAIS

O estudo das glândulas intramandibulares em Attini e Ponerini, por meio de métodos histológicos, possibilitou concluir que há três tipos de glândulas intramandibulares: células epidérmicas secretoras da classe I, glândulas unicelulares da classe III e células epiteliais secretoras com reservatório, sendo a primeira exclusiva de Ponerinae e esta última exclusiva de Attini, sugerindo variação entre tribos.

As células epidérmicas secretoras da classe I e glândulas unicelulares da classe III em *P. verenae* diferenciam-se durante a pupação, iniciando seu desenvolvimento na pupa de olho rosa e definidas completamente a partir da pupa de olho preto.

As glândulas intramandibulares em *A. laevigata*, apresentaram glândulas unicelulares da classe III e células epidérmicas secretoras com reservatório. Os estudos morfológicos, histoquímicos e morfométricos das glândulas intramandibulares em *A. laevigata* suportam a hipótese de que essas glândulas estejam envolvidas diretamente na divisão de trabalho entre as castas, e conseqüentemente na comunicação química entre elas.

As análises de comportamentos de caminhamento indicam que as substâncias das glândulas intramandibulares de *P. villosa* estão envolvidas no reconhecimento de companheiras de ninho, e a presença de hidrocarbonetos e os esteróis colesterol em operárias e o sitosterol encontrado na mandíbula de rainhas podem estar associados ao perfil da casta, sendo provável que o sitosterol encontrado apenas na mandíbula de rainha assumo o papel de um sinalizador de fertilidade, uma possível fonte de hormônio e/ou feromônio.