

**EDMILSON AMARAL DE SOUZA**

**ESTUDO COMPORTAMENTAL, PERFIL DOS  
HIDROCARBONETOS CUTICULARES E MORFOLOGIA  
DAS GLÂNDULAS MANDIBULARES E  
INTRAMANDIBULARES DE RAINHAS DE *Melipona scutellaris*  
COM DIFERENTES IDADES**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
Exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e  
Estrutural, para Obtenção do título  
de *Doctor Scientiae*

**VIÇOSA**

**MINAS GERAIS – BRASIL**

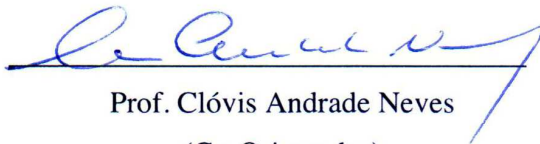
**2010**

**EDMILSON AMARAL DE SOUZA**

**ESTUDO COMPORTAMENTAL, PERFIL DOS  
HIDROCARBONETOS CUTICULARES E MORFOLOGIA  
DAS GLÂNDULAS MANDIBULARES E  
INTRAMANDIBULARES DE RAINHAS DE *Melipona scutellaris*  
COM DIFERENTES IDADES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das Exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para Obtenção do título de *Doctor Scientiae*

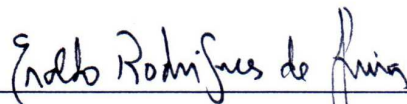
APROVADA: 26 de novembro de 2010.



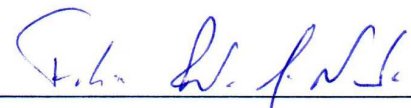
Prof. Clóvis Andrade Neves  
(Co-Orientador)



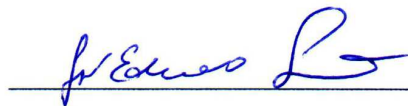
Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos  
(Co-Orientador)



Prof. Eraldo Rodrigues de Lima



Prof. Fábio Santos do Nascimento



Prof. José Eduardo Serrão

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de estudar em universidade de ótima qualidade e conhecer pessoas tão importantes para minha formação pessoal e profissional.

À mulher da minha vida Luciane pelo seu amor, compreensão, incentivo e paciência. Te amo!!!

Aos meus pais e irmãos que sempre estiveram ao meu lado para me apoiar e incentivar.

À minha sogra Dona Graça e ao meu sogro Sr. Geraldo pelo carinho.

Ao Prof. José Eduardo Serrão pelo convívio tão amigável, confiança e paciência. Sob sua orientação, cresci como pessoa e profissional.

Ao Prof. José Roberto Trigo por me receber tão bem em seu laboratório e contribuir de forma tão importante para a realização deste trabalho.

Aos meus co-orientadores Profs. Lucio Antonio de Oliveira Campos e Clóvis Andrade Neves pelos conselhos e sugestões.

Ao amigo Douglas Elias pelo auxílio nos experimentos....Sua contribuição tornou possível a realização deste trabalho.

Aos professores Eraldo Rodrigues de Lima e Fábio Santos do Nascimento por terem aceito o convite e pelas contribuições com o trabalho.

Aos Professores do curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural por contribuírem com a minha formação.

Aos amigos da pós-graduação: Claudivânia, Débora, Dihego, Luis Fernando, Kenner, Luiza, Madu, Milton, Waléria pelo convívio agradável.

Aos funcionários do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, em especial, Íris e Geraldo pelo auxílio nos experimentos.

Às secretárias do Departamento de Biologia Geral: Beth e Diana.

Aos técnicos dos laboratórios de Biologia Celular e Biologia Estrutural:  
José Luiz Monteiro e Alex.

Ao meu amigo Max que me incentivou a ingressar na carreira acadêmica.

Aos professores e amigos de Rio Paranaíba: Marlon, Michele, Vinicius,  
Luciano, Frederico, Rubens, Karine, Jaqueline, Moema, Cassiano, Silvana,  
Renato.

À Universidade Federal de Viçosa pelo ensino de qualidade.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VI</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>7</b>
<b>COMPORTAMENTO E EXECUÇÃO DE RAINHAS VIRGENS EM <i>Melipona scutellaris</i> LEP. (HYMENOPTERA, APIDAE)</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>14</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DOS HIDROCARBONETOS CUTICULARES DE RAINHAS DE <i>Melipona scutellaris</i> (HYMENOPTERA, APIDAE) COM DIFERENTES IDADES</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>36</b>
<b>HISTOLOGIA E ULTRA-ESTRUTURA DAS GLÂNDULAS MANDIBULARES E INTRAMANDIBULARES DE RAINHAS DE <i>Melipona scutellaris</i> (HYMENOPTERA, APIDAE) COM DIFERENTES IDADES</b>	<b>36</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>55</b>

## RESUMO

SOUZA, Edmilson Amaral de, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2010. **Estudo comportamental, perfil dos hidrocarbonetos cuticulares e morfologia das glândulas mandibulares e intramandibulares de rainhas de *Melipona scutellaris* com diferentes idades.** Orientador: José Eduardo Serrão. Co-orientadores: Clóvis Andrade Neves e Lucio Antonio de Oliveira Campos.

As rainhas virgens de *Melipona scutellaris*, assim como outras espécies do gênero *Melipona*, são atacadas e mortas pelas operárias. Como existe pouca informação sobre o reconhecimento destas rainhas virgens, este trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que as rainhas virgens de *M. scutellaris* são reconhecidas pelas operárias pelo uso de sinais químicos. Para tanto, o comportamento, o perfil de hidrocarbonetos cuticulares e a morfologia das glândulas mandibulares e intramandibulares das rainhas virgens em diferentes idades foram analisados. As rainhas virgens de *M. scutellaris* são atacadas e mortas pelas operárias em média quando tem sete dias de idade. Este ataque é precedido pelo contato das antenas das operárias no abdômen das rainhas e posterior decapitação das mesmas. O perfil de hidrocarbonetos cuticulares é diferente entre rainhas virgens com diferentes idades e rainhas fisogástricas, bem como entre rainhas virgens sob influência ou não da rainha fisogástrica. As células secretoras das glândulas mandibulares e intramandibulares das rainhas de *M. scutellaris* apresentaram características que indicam a participação no metabolismo de lipídios. Considerando que as rainhas virgens são atacadas a partir de sete dias de idade e neste período elas têm perfis de hidrocarbonetos cuticulares diferentes das rainhas virgens recém-emergidas, sugerimos que exista um reconhecimento químico das rainhas virgens pelas operárias. Além disso, as glândulas mandibulares e intramandibulares podem participar da síntese de compostos que participem da comunicação química nesta abelha.

## ABSTRACT

SOUZA, Edmilson Amaral de, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, November of 2010. **Behavioural study, cuticular hydrocarbon profiles and morphology of the mandibular and intramandibular glands of the queens of *Melipona scutellaris* with different ages.** Adviser: José Eduardo Serrão. Co-Advisers: Clóvis Andrade Neves and Lucio Antonio de Oliveira Campos.

The virgin queens of *Melipona scutellaris*, as others species of the genus *Melipona*, are attacked and killed for workers. As exist few information about recognition of this virgin queens, this work had as purpose to test the hypothesis that the virgin queens of *M. scutellaris* are identified by workers for the use of chemical signal. For this, the behaviour, the cuticular hydrocarbon profiles and the morphology of the mandibular and intramandibular glands of the virgin queens was analysed. The virgin queens of *M. scutellaris* are attacked and killed for workers in average with seven days of age. This attack is antedate by contact of the antenna of the workers in the abdomen of the queens and posterior decapitation. The cuticular hydrocarbon profile is different between virgin queens with different ages and fisogastric queens, as between virgin queens under influence or not of the fisogastric queen. The secretory cells of the mandibular and intramandibular glands of the queens of *M. scutellaris* showed characteristics that indicate the participation in the lipids metabolism. Considering that the virgin queens are attacked as from seven days of age and on this period they have cuticular hydrocarbon profiles different of the virgin queens newly-emerged, we suggest that exist a chemical recognition of the virgin queens by workers. Furthermore, the mandibular and intramandibular glands could to participate of the synthesis of compounds that contribute with chemical communication in this bee.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

Os insetos sociais podem ser distinguidos como um grupo de acordo com três características: indivíduos da mesma espécie cooperam com o cuidado da cria; há uma divisão reprodutiva de trabalho, com indivíduos mais estéreis ou menos estéreis trabalhando ao lado de indivíduos fecundos; e sobreposição de, no mínimo, duas gerações em estágios de vida capazes de contribuir com a divisão de trabalho na colônia. Dentre os insetos sociais são encontrados os cupins, formigas, vespas e abelhas (Wilson, 1971).

As abelhas são classificadas em níveis que vão de solitárias a altamente eussociais. De acordo com Michener (1974), a classificação das abelhas em relação à sociabilidade considera: divisão de trabalho, sobreposição de gerações e também armazenamento de provisões. A divisão de trabalho entre os indivíduos do grupo pode ocorrer em indivíduos com morfologia semelhante, mas com comportamentos diferentes, ou em indivíduos com morfologia e fisiologia diferentes executando funções diferentes no grupo. Na sobreposição de gerações a fêmea normalmente tem contato com a prole. No armazenamento de provisões, as abelhas coletam o alimento na fonte e o levam para a colônia.

As abelhas solitárias não formam colônias, sendo que a fêmea constrói as células de cria, aprovisiona e deposita nelas os ovos. Após a oviposição, a fêmea deixa o ninho antes da emergência da prole. Nas abelhas comunais, a fêmea adulta cuida e alimenta a prole imatura, mas morre antes ou durante o tempo em que a cria alcança a maturidade. Neste caso, não ocorre divisão de trabalho no ninho. As abelhas parasociais formam colônias, embora pequenas com abelhas adultas de uma única geração. Nas espécies de abelhas parasociais, a interação entre indivíduos é simples, embora em algumas espécies exista atividade cooperativa e divisão de trabalho entre as fêmeas adultas, como a postura realizada por mais de uma fêmea. Nas espécies de abelhas eussociais, o nível de organização é mais complexo, geralmente apresentando uma rainha com função reprodutiva e operárias executando as demais funções da colônia (Michener, 1974).

As abelhas eussociais são divididas em dois grupos: primitivamente e altamente eussociais. Nas espécies primitivamente eussociais, as castas são muito

semelhantes na morfologia externa, embora para a maioria das espécies as castas diferem no desenvolvimento ovariano e no comportamento, sendo que rainhas podem viver sozinhas, fundar uma nova colônia e após o estabelecimento da nova colônia é que ocorre a divisão de trabalho entre os indivíduos (Quénu, 1957; Sakagami & Fukushima, 1961; Sakagami & Hayashida, 1968, Michener, 1974).

Nas colônias de espécies altamente eussociais, a integração é complexa e envolve uma variedade de padrões comportamentais, feromônios, e adaptações fisiológicas. Nesse grupo existe a sobreposição de gerações, divisão de trabalho e armazenamento de provisões em compartimentos específicos. Devido ao armazenamento de provisões na colônia, esta sobrevive por muito tempo. As abelhas altamente eussociais são divididas em dois grupos: as abelhas sem ferrão (Tribo Meliponini) e as abelhas melíferas (Tribo Apini) (Roig-Alsin & Michener, 1993).

Segundo Monnin (2006), a comunicação química é um fator central para o funcionamento das sociedades dos insetos, sendo que os produtos de secreção das glândulas exócrinas participem dessa comunicação (Costa-Leonardo, 1978; Kaatz et al., 1992; Billen & Morgan, 1998; Pankiw et al., 1998; Strauss et al., 2006). Em *Apis mellifera*, compostos produzidos pelas glândulas mandibulares das rainhas participam do controle sobre a atividade das operárias e fisiologia. O principal composto é o ácido 9-oxidecenóico (9 ODA), responsável pela inibição da síntese do hormônio juvenil nas operárias e pelo atraso do início da fase de forrageamento, sendo o supressor do desenvolvimento dos ovários das operárias e do comportamento de construção de células para criação de rainhas, dentro da colônia, e um atraente sexual para os machos durante o vôo nupcial (Kaatz et al., 1992; Pankiw et al., 1994; Engels et al., 1997; Miller & Ratnieks, 2001).

As rainhas de abelhas sem ferrão podem exercer um controle feromonal sobre atividade e a fisiologia das operárias, como ocorre em outras espécies sociais. Após a cópula de uma rainha virgem, várias mudanças no comportamento das operárias podem ser observadas; como o aumento no consumo de pólen e produção células de cria pelas operárias nutridoras (Engels et al., 1993). Além disso, feromônios produzidos pelas rainhas virgens tem papel fundamental na

biologia reprodutiva das abelhas sem ferrão, atraindo machos para a cópula (Engels, 1987; Engels et al., 1993). Sessenta e oito compostos voláteis participantes na comunicação química foram localizados na cabeça de rainhas de *Scaptotrigona postica*, sendo que os hidrocarbonetos foram os mais abundantes seguidos dos alcoóis (Engels et al., 1993).

A cutícula dos insetos é recoberta por uma camada de lipídios, sendo os principais representantes os hidrocarbonetos: alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos. Esses hidrocarbonetos apresentam como função primordial a prevenção da perda de água (Chapman, 1988; Schal et al., 1998; Singer, 1998; Monnin, 2006), porém eles também podem participar da comunicação química nos insetos sociais (Singer, 1998; Monnin, 2006). Segundo Gibbs (2002), dentre os hidrocarbonetos cuticulares, os alcanos assumem a função de prevenção da dessecação devido aos seus altos pontos de fusão, enquanto que os alcenos são responsáveis pela comunicação química.

Nos insetos sociais, além de prevenir dessecação, os hidrocarbonetos participam da comunicação química facilitando o reconhecimento de espécies, do sexo, da colônia e do estado reprodutivo (Bonavita-Courgourdan et al., 1987; Layton et al., 1994; Singer, 1998; Ruther et al., 1998; Monnin, 2006; Hora et al., 2010). Em abelhas sem ferrão, o perfil de hidrocarbonetos cuticulares varia de acordo com a casta, idade e atividade ovariana (Abdalla et al., 2003; Kerr et al., 2004; Caliman, 2008; Caliman et al., 2010). Em *Melipona bicolor*, as operárias, machos, rainhas virgens e fisogástricas apresentam perfis de hidrocarbonetos cuticulares diferentes (Abdalla et al., 2003). Nas abelhas *Lasioglossum malachurum* e *Amegilla dawsoni*, os feromônios sexuais estão localizados na superfície da cutícula e os hidrocarbonetos são os responsáveis pela atração dos machos para a cópula (Ayasse et al., 1999; Simmons et al., 2003). Além da função de feromônios, que medeiam interações intra-específicas, os hidrocarbonetos cuticulares podem atuar como semioquímicos que medeiam interações inter-específicas, como cairomônios que são compostos emitidos por um organismo que beneficia o indivíduo que o reconhece; e alomônios que são compostos emitidos por um organismo de uma espécie que afeta o comportamento de um

indivíduo de outra espécie para beneficiar o organismo emissor (Schal et al., 1998).

Nos insetos as principais fontes de feromônios são as glândulas exócrinas (Wilson, 1963; Blum & Brand, 1972). Nas abelhas, as glândulas mandibulares, intramandibulares e de Dufour participam da síntese de compostos envolvidos na comunicação química (Costa-Leonardo, 1976; Kaatz et al., 1992; Pankiw et al., 1994; Engels et al., 1997; Katzav-Gozansky et al., 2001, Abdalla & Cruz-Landim, 2005). Essas glândulas são caracterizadas pela presença de um canal coletor revestido por cutícula que conduz a secreção até uma superfície o que as inclui no grupo das glândulas da classe III (Noirot & Quenedey, 1974, 1991). Além disso, glândulas tegumentares e o epitélio da mandíbula podem participar da produção de compostos relacionados à comunicação química dos insetos sociais (Billen & Espadaler, 2002; Hora et al, 2010). Essas glândulas estão incluídas na classe I, caracterizadas como um epitélio cilíndrico localizado sob uma cutícula (Noirot & Quenedey, 1974, 1991).

Pouco se conhece sobre a comunicação química em abelhas altamente eussociais, embora, seja sugerido que os hidrocarbonetos possam estar envolvidos nessa comunicação (Page et al., 1991; Engels et al., 1993, Monnin, 2006).

Nas espécies do gênero *Melipona* (tribo Meliponini), as rainhas virgens são menores que as operárias, emergem durante todo o ano (Koedam, 1999; Sommeijer et al., 2003; Santos-Filho et al. 2006) e, geralmente são mortas pelas operárias. Normalmente, as rainhas recém-emergidas não desencadeiam nenhuma resposta nas operárias, mas com o avanço da idade, elas movimentam-se rapidamente pela colônia requerendo alimento das operárias pelo contato com suas antenas. Acredita-se que neste estágio, a produção dos feromônios ocorra e, quando esta produção atinge o pico e as rainhas tornam-se atrativas, as operárias podem reconhecê-las e matá-las através de ataques na região da cabeça e outras partes do corpo. Outros comportamentos podem ser identificados, como a aceitação de uma rainha virgem na colônia com subsequente eliminação das outras rainhas virgens; e as rainhas virgens fundarem novas colônias (Kerr et al., 1962; Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995).

Segundo Jarau et al. (2009), o reconhecimento das rainhas virgens de *M. beecheii* ocorre pelo comportamento destas que é identificado pelas operárias desencadeando um comportamento agressivo das mesmas. Entretanto, diferenças químicas entre castas já foram identificadas em algumas espécies de abelhas altamente eussocias (Abdalla et al., 2003; Kerr et al, 2004; Caliman, 2008; Nunes et al., 2009), sugerindo que possa existir algum sinal químico emitido pelas rainhas virgens para que sejam reconhecidas e atacadas pelas operárias.

## **OBJETIVO**

Considerando as poucas informações sobre execução de rainhas virgens das espécies do gênero *Melipona* pelas operárias, este trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que as rainhas virgens de *Melipona scutellaris* são reconhecidas pelas operárias pelo uso de sinais químicos. Para tanto, foram avaliados i) o comportamento das rainhas virgens em diferentes idades; ii) o perfil de hidrocarbonetos cuticulares de rainhas virgens com idades diferentes e rainhas fisogástricas; e iii) a estrutura das glândulas mandibulares e intramandibulares como potenciais fontes de feromônios.

## CAPÍTULO 1

### COMPORTAMENTO E EXECUÇÃO DE RAINHAS VIRGENS EM *Melipona scutellaris* Lep. (HYMENOPTERA, APIDAE)

#### INTRODUÇÃO

O Brasil tem a maior diversidade de abelhas sem ferrão (Meliponini) do mundo, as quais são responsáveis por grande parte da polinização de espécies nativas (Kerr et al., 1996; Kerr et al., 1999). Dentre as abelhas sem ferrão, *Melipona scutellaris* é uma espécie encontrada na faixa litorânea do nordeste brasileiro entre os estados da Bahia e do Rio Grande do Norte, sendo importante na polinização de espécies nativas e produção de mel de ótima qualidade, constituindo uma boa fonte de renda para os meliponicultores da região (Moure & Kerr, 1950; Lamartine, 1962).

Nas espécies do gênero *Melipona*, as rainhas virgens são menores que as operárias e emergem sem atratividade, sem desencadear uma resposta específica nas operárias (Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995) e diferentemente de outras espécies de abelhas eussociais elas produzem rainhas durante toda a vida da colônia, as quais podem representar de 4 a 7% dos indivíduos na colônia (Koedam, 1999; Sommeijer et al., 2003; Santos-Filho et al., 2006). Geralmente, as rainhas do gênero *Melipona* copulam com um único macho quando têm entre três e oito dias de idade (Kerr et al., 1962; Silva et al., 1972). Segundo Kerr et al. (1962), em uma colônia de *Melipona quadrifasciata* contendo uma rainha fisogástrica, as demais rainhas virgens são atacadas e mortas pelas operárias e mesmo quando a colônia está órfã, as operárias continuam a matar as rainhas virgens até quatro dias após a morte ou retirada da rainha fisogástrica. As rainhas virgens também podem ser expulsas da colônia e, em alguns casos, a rainha virgem pode ser aceita pela colônia e as demais rainhas virgens são eliminadas pelas operárias (Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995).

Em *M. marginata* e *M. beecheii*, as operárias também apresentam um comportamento agressivo em relação às rainhas virgens levando-as à morte (Kleinert & Imperatriz-Fonseca, 1994; Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995; Jarau et al., 2009). As rainhas mais ativas na colônia, apresentando movimentos rápidos,

são perseguidas pelas operárias enquanto rainhas que se movimentam pouco são ignoradas (Van Veen et al., 1999; Jarau et al., 2009).

Os mecanismos envolvidos no comportamento de agressividade das operárias em relação às rainhas virgens são pouco compreendidos. Existe a hipótese de que, diferenças nos compostos voláteis produzidos por rainhas virgens com diferentes idades estariam envolvidos no processo de reconhecimento dessas pelas operárias como relatado para *A. mellifera capensis* (Wossler et al., 2006). Além disso, diferenças na composição dos hidrocarbonetos cuticulares de rainhas e operárias supostamente apontam um importante papel desses no reconhecimento dos indivíduos no ninho (Abdalla et al., 2003; Kerr et al., 2004; Caliman, 2008; Monnin, 2006; Nunes et al., 2009). Outra hipótese é que o comportamento das rainhas virgens induz as operárias ao ataque e consequente execução das mesmas (Jarau et al., 2009).

Dada a importância de *M. scutellaris* e a escassez de trabalhos envolvendo diferentes aspectos da sua biologia, este trabalho teve como objetivo identificar o comportamento das rainhas virgens com diferentes idades e determinar o período no qual o comportamento agressivo das operárias em relação às rainhas virgens é iniciado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Estudo da colônia das abelhas**

O experimento foi realizado entre março e abril de 2008 no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (20°45'14" N, 42°52'55" E), Minas Gerais, Brasil. Duas colônias de *M. scutellaris* mantidas entre 29-32°C foram utilizadas para o experimento. Uma colônia foi utilizada como colônia de observação, consistindo de uma caixa de madeira (20x20x10cm), contendo operárias e a rainha fisogástrica. Esta caixa foi coberta com tampa de vidro e papel transparente vermelho de modo a permitir a observação e registro do comportamento das rainhas virgens e operárias. A outra colônia foi utilizada para retirada de favos de cria para obtenção de rainhas virgens recém-emergidas. Após a emergência, as rainhas foram marcadas com tinta atóxica de diferentes cores de

acordo com a data de emergência e colocadas na caixa de observação para análise do seu comportamento.

### **Observações comportamentais**

O comportamento e as interações das rainhas e operárias foram registrados por observações diretas na colônia. Para cada rainha foi anotado o dia de emergência, seus comportamentos e interações com as operárias e a data da morte. No total 30 rainhas foram acompanhadas totalizando 300 horas de observação.

## **RESULTADOS**

Das trinta rainhas virgens estudadas, vinte e três foram mortas por ataques das operárias, enquanto que sete morreram de causa desconhecida, já que nenhum sinal de agressão foi encontrado. Rainhas virgens com até quatro dias de idade não foram atacadas pelas operárias, enquanto as rainhas virgens com idades entre cinco e nove dias de idade foram executadas pelas operárias (Gráfico 1).

As rainhas virgens recém-emergidas de *M. scutellaris* apresentaram comportamento mais ativo quando comparadas às operárias recém-emergidas. As operárias recém-emergidas permaneceram estáticas, enquanto as rainhas virgens recém-emergidas se movimentavam lentamente. Inicialmente, as rainhas virgens permaneceram restritas à região próxima das células de cria, realizando movimentos lentos, os quais se tornaram mais rápidos somente após o contato com algum outro indivíduo da colônia. A seguir, a rainha procurava se abrigar em lugares pequenos, como células de cria vazias e espaços entre os favos de cria.

À medida que envelheciam, do primeiro ao terceiro dia de idade, as rainhas virgens tornaram-se mais ativas e começaram a percorrer de forma mais rápida outras regiões do ninho, além da área de cria. Até o quarto dia de vida das rainhas virgens, as operárias não apresentaram nenhum comportamento agressivo contra as mesmas.

Do quinto ao nono dia de vida, as rainhas virgens percorreram rapidamente o ninho em busca de abrigo nos cantos, frestas entre os potes de mel e as células de cria. Apenas as operárias mais velhas, caracterizadas pela maior pigmentação do corpo, mostraram agressividade contra as rainhas virgens a partir do quinto dia

de idade. O reconhecimento das rainhas virgens e o comportamento agressivo a essas por parte das operárias foi antecedido pelo contato das antenas próximo a região do abdômen e da cabeça da rainha virgem. Logo em seguida ocorreu intensa agressividade no qual as operárias utilizaram suas mandíbulas para atacar a rainha, tentando decapitá-la. Nesse ataque, algumas operárias seguravam as pernas e as asas das rainhas com as mandíbulas, enquanto outras se posicionavam no dorso, decapitando a rainha.

## DISCUSSÃO

Os resultados sugerem que o comportamento das rainhas virgens de *M. scutellaris* varia de acordo com a idade e que o comportamento agressivo das operárias em relação às rainhas depende da idade das rainhas. As rainhas virgens recém-emergidas não desencadeiam uma resposta agressiva nas operárias, mas a partir do quinto dia de idade há agressividade contra elas por parte das operárias. Resultados semelhantes foram observados em outras espécies como *M. beecheii* (van Veen et al., 1999; Wenseleers et al., 2004), *M. compressipes* (Sakagami & Oniki, 1963), *M. quadrifasciata* (Sakagami et al., 1965; Silva et al., 1972), *M. marginata* (Kleinert & Imperatriz-Fonseca, 1994; Kleinert, 2005) e *M. favosa* (Koedam et al., 1995), embora com variações nas idades nas quais as rainhas virgens começam a ser atacadas pelas operárias.

No comportamento de ataque das operárias de *M. scutellaris*, essas tentavam decapitar a rainha, concentrando-se nas regiões do tórax e da cabeça, diferentemente do observado para *M. beecheii* em que as operárias atacam a rainha virgem na região próxima do abdômen (Jarau et al., 2009). Os resultados mostraram que a região do abdômen das rainhas não foi o alvo principal das operárias. Entretanto, essa região parece ser importante no reconhecimento da rainha virgem, uma vez que o comportamento de agressividade somente ocorria após o contato das antenas das operárias com essa região do corpo. No abdômen dos Meliponini estão localizadas dorsalmente glândulas unicelulares da classe III, sendo mais desenvolvidas em rainhas do que em operárias, indicando que sua secreção funcione como feromônios (Abdalla & Cruz-Landim, 2002; Guerino & Cruz-Landim, 2003). Hora et al. (2010) sugerem que a secreção das glândulas

epidérmicas de *Ectatomma tuberculatum* (Formicidae) participe da comunicação química como um sinal de fertilidade das rainhas. Além disso, na porção final do abdômen das rainhas das abelhas há a glândula de Dufour que parece ser responsável pela produção de hidrocarbonetos cuticulares importantes para o reconhecimento da rainha dentro da colônia (Abdalla & Cruz-Landim, 2004).

O reconhecimento das rainhas pelas operárias através de suas antenas reforça a hipótese que existe um reconhecimento químico, já que nas antenas das abelhas são encontrados vários tipos quimiorreceptores (Guss-Matiello, 2008; Blomquist & Bagnères, 2010). Além disso, na formiga *Pachycondyla inversa*, rainhas férteis, caracterizadas pela presença do hidrocarboneto 3,11-dimetilheptacosano em sua cutícula, são reconhecidas na colônia pelas operárias através do toque com suas antenas (D'Ettore et al., 2004).

Os hidrocarbonetos variam de acordo com as castas das abelhas (Abdalla et al., 2003; Kerr et al., 2004; Caliman, 2008; Nunes et al., 2009). Entretanto, informações sobre o perfil de hidrocarbonetos cuticulares em rainhas virgens com diferentes idades permanecem escassas. Segundo Caliman (2008), rainhas virgens recém-emergidas apresentam perfil de hidrocarbonetos cuticulares semelhante ao perfil de hidrocarbonetos de rainhas virgens com dois dias de idade, mas perfil diferente das rainhas virgens no período no qual são atacadas pelas operárias. Como os hidrocarbonetos cuticulares são considerados feromônios de contato (Ebbs & Amrein, 2007), acredita-se que os hidrocarbonetos cuticulares possam funcionar como um sinal de reconhecimento das rainhas virgens pelas operárias e, que este reconhecimento ocorra através do contato das antenas das operárias no abdômen das rainhas virgens antecedendo o ataque e morte das mesmas.

O comportamento de fuga das rainhas virgens parece ser uma resposta à agressividade das operárias e não um comportamento que desencadeie o ataque por parte das operárias como proposto por Jarau et al. (2009). Já o comportamento de agressividade das operárias pode ser em resposta ao reconhecimento dos compostos produzidos pelas rainhas virgens, sugerindo uma possível mudança na produção e composição de compostos voláteis à medida que as rainhas

envelhecem e uma consequente mudança na resposta comportamental por parte das operárias.

Compostos produzidos pelas glândulas mandibulares também podem funcionar como sinal de reconhecimento das rainhas virgens. Em *A. mellifera capensis* foi demonstrado que compostos produzidos pela glândula mandibular de rainhas virgens mudam com a idade e afetam as respostas comportamentais de operárias, sendo que rainhas virgens recém-emergidas apresentam significativo aumento da produção de (E)-ácido-9-oxidec-2-enóico (9ODA) e significativa diminuição da produção de (E)-ácido-9-hidroxidec-2-enóico (9HDA) à medida que envelhecem, essas mudanças são acompanhadas pelo aumento da agressividade das operárias (Wossler et al., 2006). Neste sentido, em *M. scutellaris*, uma possível mudança na produção de compostos produzidos pela glândula mandibular das rainhas virgens a partir de cinco dias de idade poderia estar associada ao aumento da agressividade das operárias.

## **CONCLUSÃO**

A partir de cinco dias de idade as rainhas virgens de *M. scutellaris* adotam um comportamento de fuga e neste período as operárias expressam um comportamento agressivo em relação às rainhas que são atacadas na da cabeça, até a morte, resultando em um tempo médio de vida para estas rainhas dentro da colônia de sete dias.

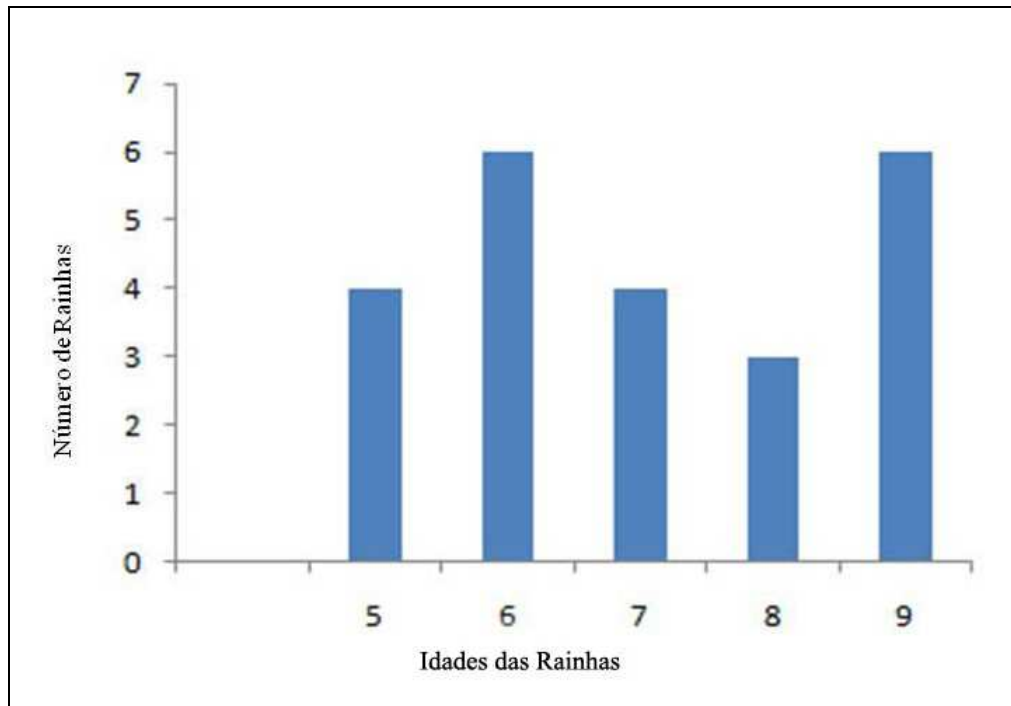


Gráfico 1: Representação do número de rainhas virgens de *Melipona scutellaris* mortas pelas operárias a partir de cinco dias de idade.

## CAPÍTULO 2

### CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DOS HIDROCARBONETOS CUTICULARES DE RAINHAS DE *Melipona scutellaris* (HYMENOPTERA, APIDAE) COM DIFERENTES IDADES

#### INTRODUÇÃO

A cutícula é uma secreção da epiderme que reveste o corpo do inseto, formando o exoesqueleto, bem como delimitando a luz de todos os órgãos derivados do ectoderma. A quitina encontrada na cutícula é formada por resíduos de N-acetil-glicosamina unidos por ligações  $\beta$  1-4 e está associada a vários tipos de proteínas que podem variar de acordo com a região do corpo do inseto. Além da quitina e proteínas, os lipídios também são encontrados na cutícula e são importantes para a rigidez da mesma (Wigglesworth, 1957; Andersen, 1979; Chapman, 1988).

A epicutícula, região mais externa da cutícula, é desprovida de quitina. é formada por várias camadas, contendo lipoproteínas (cuticulina) e lipídios. Nessa região da cutícula, uma camada de cera constituída por diferentes compostos é encontrada, sendo os hidrocarbonetos os principais componentes, variando de acordo com o número de átomos de carbono (Wigglesworth, 1957; Andersen, 1979; Chapman, 1988). Segundo Singer (1998), a função primordial dos hidrocarbonetos cuticulares é prevenir a perda de água.

Os hidrocarbonetos cuticulares dos insetos são uma mistura de alcanos lineares, alcanos ramificados, alcenos e, em algumas espécies, alcadienos e alcenos ramificados. Alcanos e alcenos diferem em seus pontos de fusão e, conseqüentemente, não formam uma mistura homogênea (Chapman, 1998; Gibbs, 2002). Segundo Gibbs (2002), os alcanos são responsáveis pela resistência à dessecação devido aos seus altos pontos de fusão, enquanto que os alcenos são utilizados na comunicação química. Wagner et al. (2001) verificaram que os alcanos lineares apresentam concentrações diferentes nas castas da formiga *Pogonomyrmex barbatus*. As operárias forrageiras e patrulheiras que permanecem longos períodos fora da colônia e estão mais sujeitas dessecação apresentam maior proporção de alcanos do que as operárias que permanecem na colônia.

Estudos com insetos sociais indicam que os hidrocarbonetos cuticulares são espécie-específicos e colônia-específicos (Breed, 1983; Bonavita-Courgourdan et al., 1987; Haverty et al., 1988; Singer, 1998; Blomquist & Bagnères, 2010). Assim esses insetos podem ser reconhecidos e aceitos em suas colônias, enquanto indivíduos não reconhecidos são rejeitados. Esse reconhecimento é fundamental para a manutenção da estrutura social desses insetos (Singer, 1998). Além disso, os hidrocarbonetos também podem atuar como feromônios de contato, cairomônios e alomônios (Howard, 1993; Ebbs & Amrein, 2007; Hora et al., 2010).

Alguns insetos eussociais demonstram perfil de hidrocarbonetos cuticulares variáveis de acordo com as castas, idade e atividade ovariana (Cuvillier-Hot et al., 2001; Abdalla et al., 2003; Kerr et al., 2004; Caliman, 2008; Nunes et al., 2009; Blomquist & Bagnères, 2010).

Em várias espécies do gênero *Melipona*, rainhas virgens são produzidas ao longo de todo o ano podendo compreender cerca 4-7% dos indivíduos presentes no ninho (Koedam, 1999; Sommeijer et al., 2003; Santos-Filho et al., 2006), porém, se estas rainhas não enxamearem, não forem expulsas ou não fugirem da colônia, elas serão mortas pelas operárias (Silva et al., 1972; Impertatriz-Fonseca & Zuchi, 1995), mas o sinal que leva a essa execução por parte das operárias permanece desconhecido.

Considerando que em *M. scutellaris* as rainhas virgens a partir de cinco dias de idade são mortas pelas operárias (Capítulo 1), esse trabalho teve como objetivo verificar se existem diferenças entre os perfis de hidrocarbonetos cuticulares de rainhas virgens com diferentes idades e de rainhas fisogástricas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais**

Rainhas virgens recém-emergidas, rainhas virgens com oito dias de idade e rainhas fisogástricas de *M. scutellaris* foram obtidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. As rainhas recém-

emergidas foram obtidas de favos de cria retirados das colônias, mantidos a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  e observados diariamente.

Para obtenção de rainhas virgens com oito dias de idade, as rainhas virgens recém-emergidas foram inseridas em gaiolas de grade de metal com operárias nutridoras, pólen e mel *ad lib.*. Essas gaiolas foram introduzidas nas colônias de onde os indivíduos foram obtidos, até atingirem oito dias de idade. Essa metodologia foi utilizada porque, a partir de cinco dias de idade, as operárias campeiras demonstram comportamento agressivo, matando as rainhas virgens (Capítulo 1).

Para verificar se a presença da rainha fisogástrica influenciava na composição de hidrocarbonetos cuticulares das rainhas virgens, favos de cria foram retirados da colônia, mantidos à  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  e observados diariamente para coleta das rainhas virgens recém-emergidas. Posteriormente essas rainhas foram mantidas em placas de Petri com operárias nutridoras, pólen e mel *ad lib.* a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  até atingirem oito dias de idades.

Para verificar se o estado reprodutivo da rainha altera a composição de hidrocarbonetos cuticulares, rainhas fisogástricas também foram analisadas. Essas rainhas foram coletadas em diferentes colônias de *M. scutellaris*.

### **Obtenção dos extratos de hidrocarbonetos cuticulares**

Para extração dos hidrocarbonetos cuticulares, três rainhas virgens recém-emergidas, seis rainhas virgens com oito dias de idade (sendo três rainhas virgens na presença e três na ausência da rainha fisogástrica) e duas rainhas fisogástricas foram mergulhadas em 500 $\mu\text{L}$  de hexano por 10 minutos em recipientes de vidro. Após esse procedimento, o hexano foi evaporado para, posteriormente, a amostra ser diluída em 50 $\mu\text{L}$  de hexano.

### **Cromatografia gasosa e espectrometria de massa**

Os extratos dos componentes cuticulares foram analisados no Laboratório de Ecologia Química do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas – S.P.

As análises foram realizadas utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) por impacto de elétrons em um cromatógrafo a gás (Hewlett Packard 6890) equipado com injetor automático (Hewlett Packard 7683) e coluna de sílica fundida (HP-5MS 5% fenil 95% metil siloxane capilar 30m x 250 $\mu$ m x 0,25 $\mu$ m nominal, Hewlett Packard) diretamente acoplado a um detector seletivo de massa Hewlett Packard 5973. Todas as análises foram realizadas de acordo com as seguintes condições: As amostras foram diluídas em 50 $\mu$ L de hexano grau resíduo. O volume injetado foi de 1 $\mu$ L à temperatura de 270°C sem razão de divisão. O programa de temperatura utilizado foi de 60-230°C a 20°C/min e 230-300°C a 2°C/min, e 10 min a 300°C; com o gás de arraste He 1,2 mL/min; e energia de ionização de 70 eV. Quando necessário as amostras foram co-injetadas com n-alcanos para determinação do Índice de Retenção.

Os compostos foram identificados a partir de seus Índices de Retenção (Carlson *et al.* 1998), e pelos seus padrões de fragmentação (Carlson *et al.* 1999, Nelson *et al.* 1981, Pomonis, 1989).

### **Estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística multivariada para comparar rainhas fisogástricas, rainhas virgens com oito dias (na presença e ausência da rainha fisogástrica) e rainhas recém-emergidas. A análise dos componentes principais (PCA) foi utilizada para identificação dos grupos.

Os compostos ausentes na maior parte dos indivíduos de cada grupo foram excluídos das análises estatísticas e os compostos restantes foram submetidos aos testes de Bartlett, Kochan e Levene para verificar a homogeneidade das variâncias entre os tratamentos (rainhas) e cada variável (compostos). A homogeneidade das variâncias é uma das pressuposições da análise multivariada dos componentes principais (CP). Os compostos que apresentaram significância a esses testes foram retirados da análise, restando vinte dois compostos que foram utilizados para os componentes principais.

Os componentes principais gerados foram submetidos ao teste ANOVA e comparação de médias segundo teste de Duncan, sendo ambas as análises conduzidas ao nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

O conjunto de hidrocarbonetos cuticulares de rainhas de *M. scutellaris* foi formado por alcanos lineares e ramificados, alcenos e alcadienos, com cadeias variando de 23 a 39 átomos de carbonos, totalizando 73 compostos (Tabela 1).

As análises demonstraram que existem diferenças entre os perfis de hidrocarbonetos cuticulares de rainhas virgens com diferentes idades e rainhas fisogástricas de *M. scutellaris* (Tabela 1; Figuras 1-4). As rainhas virgens recém-emergidas apresentaram  $14,8 \pm 6,2\%$  do composto tricosano em suas cutículas, enquanto as rainhas virgens com oito dias de idade e rainhas fisogástricas apresentaram porcentagens menores, sendo que as rainhas virgens com oito dias de idade na presença da rainha fisogástrica apresentaram  $3,05 \pm 0,75\%$ , na ausência da rainha fisogástrica  $2,92 \pm 1\%$  e as rainhas fisogástricas  $3,55 \pm 0,5\%$  do composto tricosano (Tabela 1). O composto pentacosano foi encontrado em maior concentração em rainhas virgens recém-emergidas ( $4,5 \pm 1,5\%$ ) do que em rainhas virgens com oito dias de idade na presença ( $1,63 \pm 0,53\%$ ) e ausência ( $1,94 \pm 0,68\%$ ) da rainha fisogástrica. Além disso, esse composto apresentou concentração baixa em rainhas fisogástrica ( $0,54 \pm 0,23\%$ ) quando comparado com as rainhas virgens.

A concentração do composto pentacosano apresentou-se semelhante nas rainhas independente da idade e estado reprodutivo (Tabela 1). Entretanto, os compostos heptacosano e nonacosano apresentaram-se mais abundantes em rainhas virgens com oito dias de idade independente da presença ou ausência da rainha fisogástrica do que em rainhas virgens recém-emergidas e fisogástricas (Tabela 1).

Alguns compostos cuticulares das rainhas virgens e fisogástricas apresentaram diferentes concentrações quando comparados. Os alcenos: heptacoseno, hentriaconteno e tritriaconteno apresentaram maiores concentrações em rainhas virgens do que em rainhas fisogástricas, enquanto os alcanos

ramificados de cadeias longas apresentaram maiores concentrações em rainhas fisogástricas (Tabela 1).

Tetracosano, dotriacontano, o triacontanil acetato e outros alcanos ramificados de cadeias longas foram encontrados apenas nas rainhas fisogástricas (Tabela 1).

Vinte e oito compostos foram submetidos aos testes de homogeneidade de variâncias, sendo seis compostos, significativos aos testes, excluídos para atender as exigências da análise multivariada de componentes principais (CPs) (Tabela 2). Os vinte e dois compostos que atenderam a pressuposição de homogeneidade de variâncias foram submetidos à análise de componentes principais (Tabela 3). Os três primeiros CPs gerados representaram, em conjunto, 95,2% da variação que ocorre no grupo de variáveis. A Tabela 4 mostra cada CP com seus respectivos agrupamentos de compostos segundo seus coeficientes.

Os valores gerados para cada componente principal (Tabela 5) foram utilizados para ANOVA, sendo que para os componentes principais 1 e 2, pelo menos um grupo de rainhas diferencia-se dos demais ( $P < 0,05$ ), enquanto o componente principal 3 não permite diferenciar estatisticamente os grupos de rainhas.

O teste de médias para componente principal 1 mostrou que os compostos representados por essa variável permitem diferenciar as rainhas fisogástricas das rainhas virgens recém-emergidas e rainhas virgens com oito dias de idade assim como as rainhas virgens com oito dias de idade na ausência ou presença da rainha fisogástrica (Figura 5).

O teste de médias para o componente principal 2 mostrou que os compostos representados por esse componente permitem distinguir as rainhas virgens recém-emergidas das demais rainhas (Figura 5).

## **DISCUSSÃO**

Esse trabalho mostrou que existem diferenças no perfil de hidrocarbonetos cuticulares de rainhas virgens com diferentes idades e rainhas fisogástricas de *M. scutellaris*. Diferentes perfis de hidrocarbonetos cuticulares foram encontrados

nas castas de outras espécies de abelhas sem ferrão (Abdalla et al., 2003; Kerr et al., 2004; Caliman, 2008; Nunes et al., 2009). Entretanto, poucos trabalhos relacionaram o perfil de hidrocarbonetos cuticulares entre rainhas virgens com diferentes idades. Segundo Caliman (2008), rainhas virgens recém-emergidas e com dois dias de idade de *M. marginata* não apresentam diferenças significativas no perfil de hidrocarbonetos cuticulares, mas estas apresentam perfis diferentes das rainhas virgens que são agredidas pelas operárias.

A mudança no perfil de hidrocarbonetos cuticulares das rainhas virgens de *M. scutellaris* de acordo com a idade pode estar relacionada à atratividade dessas aos machos, pois na espécie *Melipona quadrifasciata*, rainhas são receptivas aos machos entre três e oito dias de idade, época que ocorre o vôo nupcial (Silva et al., 1972). Segundo Ayasse et al. (1999), os feromônios sexuais da abelha *Lasioglossum malachurum* estão localizados na superfície da cutícula e os hidrocarbonetos exercem o papel de atração de machos para a cópula. Na espécie *Amegilla dawsoni*, os hidrocarbonetos cuticulares também exercem a função de atração de machos para cópula (Simmons et al., 2003).

Considerando que as rainhas virgens de *M. scutellaris* com até quatro dias de idade não desencadeiam nenhum comportamento agressivo nas operárias (Capítulo 1) e que rainhas virgens com idades diferentes apresentam perfis de hidrocarbonetos cuticulares diferentes, pode ser sugerido que os hidrocarbonetos cuticulares apresentem dupla resposta nos indivíduos da colônia, atraindo machos para cópula e desencadeando comportamento agressivo por parte das operárias, que culmina com a execução das mesmas, quando estas rainhas não abandonam o ninho. Caliman (2008) observou resultados semelhantes em *M. marginata* cujas rainhas virgens agredidas pelas operárias apresentavam perfil de hidrocarbonetos cuticulares diferente daqueles encontrados em rainhas virgens com até dois dias de idade e em rainhas fisogástricas. Por outro lado, Jarau et al. (2009a) verificaram que o comportamento agressivo por parte das operárias contra rainhas virgens de *M. beecheii* é devido ao comportamento destas rainhas, que consiste de movimentação rápida na área de cria da colônia e batimento das asas, sem a participação de sinais químicos, embora não tenham realizado nenhum teste químico para verificar a existência de diferenças nos compostos cuticulares de

rainhas que não são atacadas e rainhas que são atacadas pelas operárias. Neste sentido, nós consideramos que o comportamento das rainhas virgens de *M. beecheii* pode ser consequência e não a causa do comportamento agressivo por parte das operárias, o qual seria desencadeado por sinais químicos nas rainhas virgens.

Os resultados aqui obtidos com rainhas virgens de *M. scutellaris* comprovam que a alteração no perfil de hidrocarbonetos cuticulares, além de estar relacionada com a idade da abelha, sofre influência da presença da rainha fisogástrica, pois as rainhas virgens com oito dias de idade na presença da rainha fisogástrica apresentaram perfil de hidrocarbonetos cuticulares diferente do perfil daquelas mantidas sem a rainha fisogástrica. As rainhas fisogástricas de *M. scutellaris* apresentaram perfis de hidrocarbonetos cuticulares diferentes das demais rainhas analisadas, apresentando maior diversidade de compostos, incluindo hidrocarbonetos ramificados de cadeias longas, o que também foi encontrado em *M. bicolor* que tem maior diversidade de hidrocarbonetos, especialmente os alcanos de cadeias longas e ramificadas (Abdalla et al., 2003). Segundo Abdalla et al. (2003) e Caliman (2008), o perfil de hidrocarbonetos cuticulares das rainhas fisogástricas indica que elas podem ser reconhecidas na colônia, enquanto as rainhas virgens recém-emergidas não são reconhecidas apresentando perfil de hidrocarbonetos cuticulares semelhante ao de operárias recém-emergidas. Além disso, o sinal da rainha fisogástrica pode permanecer na colônia por até três dias e esse sinal pode desencadear o comportamento agressivo das operárias em relação às rainhas virgens (Jarau et al., 2010). Desta maneira, a rainha fisogástrica parece controlar a expressão de hidrocarbonetos cuticulares presentes nas rainhas virgens, permitindo que as mesmas sejam reconhecidas e atacadas pelas operárias, embora os mecanismos pelos quais a rainha fisogástrica exerça este controle permaneça desconhecido.

O triacontanil acetato parece ser um marcador da rainha fisogástrica, pois esta substância, embora presente nesta rainha, não foi encontrado em rainhas virgens. Pianaro et al. (2007) verificaram que operárias de *M. scutellaris* apresentam alta concentração de triacontanil acetato e que a concentração desse composto aumenta quando a colônia é invadida por operárias de *M. rufiventris*.

Assim, nós sugerimos que a ausência do triacontanil acetato associado a outros compostos presentes na cutícula das rainhas virgens possa desencadear o comportamento agressivo das operárias.

A diferença no perfil de hidrocarbonetos cuticulares entre a rainha fisogástrica e as rainhas virgens de *M. scutellaris* pode ser decorrente da cópula. Vários trabalhos com insetos solitários e sociais indicam que a cópula está associada à mudança no perfil de hidrocarbonetos cuticulares (Polerstock et al., 2002; Abdalla et al., 2003; Howard & Blomquist, 2005; Hora et al., 2008; Oppelt et al., 2009; Everaerts et al., 2010; Izzo et al., 2010). Segundo Cuvillier-Hot et al. (2001), a idade e a fertilidade são os dois fatores relacionados à variação de hidrocarbonetos na formiga *Diacamma ceylonense* (Formicidae), pois adultos recém-emergidos apresentam o mesmo perfil de hidrocarbonetos cuticulares, o qual é alterado com a idade e com o estado reprodutivo, uma vez que operárias com atividade de oviposição apresentam perfil de hidrocarbonetos cuticulares diferente dos adultos recém-emergidos e adultos mais velhos.

## CONCLUSÃO

O perfil de hidrocarbonetos cuticulares de rainhas virgens de *M. scutellaris* sofre alteração de acordo com a idade. Essa alteração no perfil de hidrocarbonetos cuticulares de rainhas virgens ocorre com o avançar da idade, independente da presença da rainha fisogástrica. Entretanto, rainhas virgens com oito dias de idade na presença e ausência da rainha fisogástrica apresentam perfis de hidrocarbonetos cuticulares diferentes, indicando que a presença da rainha fisogástrica influencia na composição cuticular das rainhas virgens, sugerindo que o sinal para o reconhecimento do estado reprodutivo da rainha seja químico e não comportamental.

O estado reprodutivo da rainha está relacionado à mudança no perfil de hidrocarbonetos cuticulares, já que rainhas virgens apresentam perfis diferentes do perfil de hidrocarbonetos cuticulares das rainhas fisogástricas.

Os resultados apresentados sugerem que os hidrocarbonetos cuticulares podem participar dos processos de reconhecimento das rainhas recém-emergidas,

rainhas virgens com oito dias na presença e ausência da rainha fisogástrica e rainha fisogástrica na colônia.

Tabela 1: Média e desvio padrão da abundância relativa de hidrocarbonetos em rainhas de *Melipona scutellaris* (RE-VE = rainha recém-emergida, RV8-CF = rainha virgem com oito dias de idade na presença da rainha fisogástrica, RV8-SF = rainha virgem com oito dias de idade na ausência da rainha fisogástrica, RF = rainha fisogástrica, IR = índice de retenção). C<sub>n</sub>: número de carbonos; Me: metil; Dime: dimetil. A posição das duplas ligações nos alcenos não está indicada.

	Composto	Abelhas				IR
		RV-RE	RV8-CF	RV8-SF	RF	
<b>1</b>	Tricosano (C23)	14,8 ± 6,2	3,05 ± 0,75	2,92 ± 1	3,55 ± 0,5	2300
<b>2</b>	3-Me C23	-	-	-	0,45	2370
<b>3</b>	Alcano ramificado desconhecido	-	1,12 ± 1,15	0,38 ± 0,65	-	2373
<b>4</b>	Tetracosano (C24)	-	-	-	0,58 ± 0,09	2400
<b>5</b>	Pentacoseno (x-C25:1)	4,5 ± 1,5	1,63 ± 0,53	1,94 ± 0,68	0,54 ± 0,23	2467
<b>6</b>	Pentacosano (C25)	6,1 ± 2,5	8,5 ± 0,92	8,36 ± 2,84	8,64 ± 0,45	2500
<b>7</b>	13-, 11-Me C25	1,12 ± 0,41	0,35 ± 0,36	-	2,68 ± 0,36	2530
<b>8</b>	5-Me C25	1,39 ± 0,22	0,43 ± 0,39	-	0,49 ± 0,04	2545
<b>9</b>	Alcano ramificado desconhecido	-	-	-	0,19 ± 0,27	2561
<b>10</b>	3-Me C25	-	0,41 ± 0,4	-	-	2568
<b>11</b>	5,12-, 5-10-, 5,8-DiMe C25	-	-	-	0,41 ± 0,03	2582
<b>12</b>	Heptacoseno (x-C27:1)	3,65 ± 1,59	6,21 ± 2,16	7,92 ± 1,58	0,87 ± 0,25	2673
<b>13</b>	Heptacosano (C27)	3,04 ± 1,24	9,04 ± 2,53	9,05 ± 1,25	2,79 ± 0,1	2700
<b>14</b>	13-, 11-, 9-Me C27	0,22 ± 0,38	0,81 ± 0,4	-	1,32 ± 0,35	2731
<b>15</b>	5-Me C27	1,16 ± 0,26	0,19 ± 0,32	-	-	2747
<b>16</b>	3-Me C27	1,01 ± 0,21	0,22 ± 0,39	-	-	2771
<b>17</b>	5,12-, 5-10-, 5,8-DiMe C27	-	-	-	0,69 ± 0,01	2782
<b>18</b>	Alcano ramificado desconhecido	0,26 ± 0,45	-	-	-	2812
<b>19</b>	Nonacoseno (x-C29:1)	4,09 ± 0,75	4,47 ± 0,72	5,51 ± 0,28	0,84 ± 0,21	2875

Tabela 1: Continuação

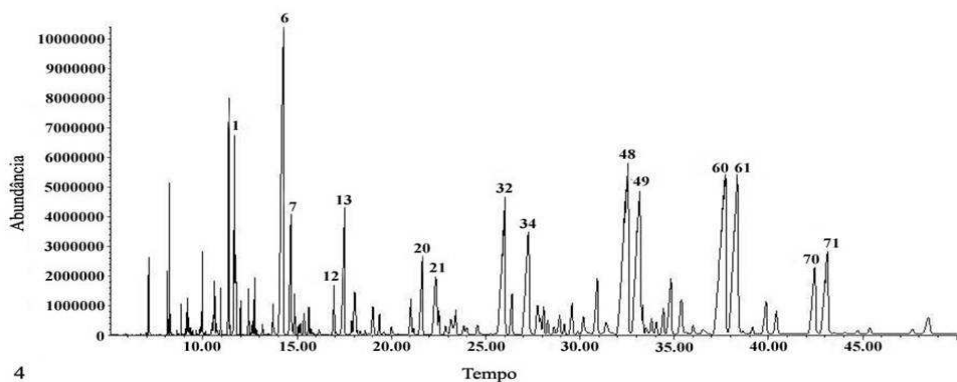
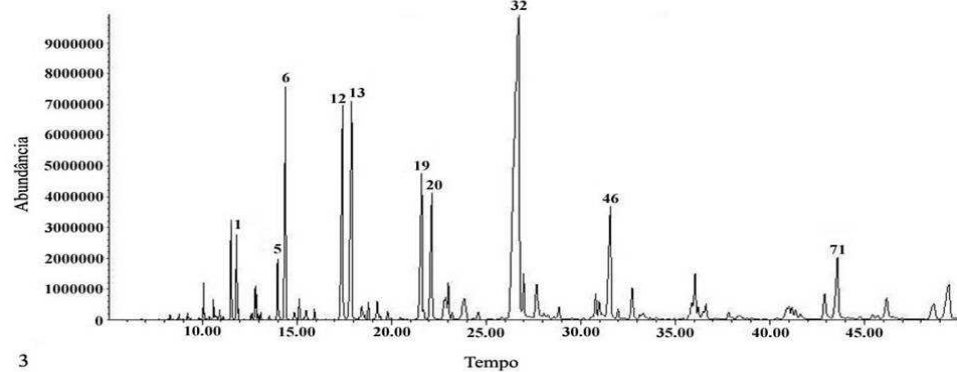
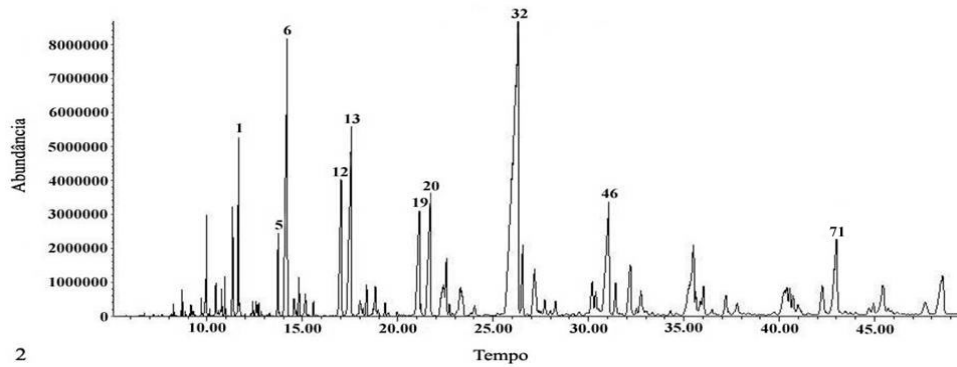
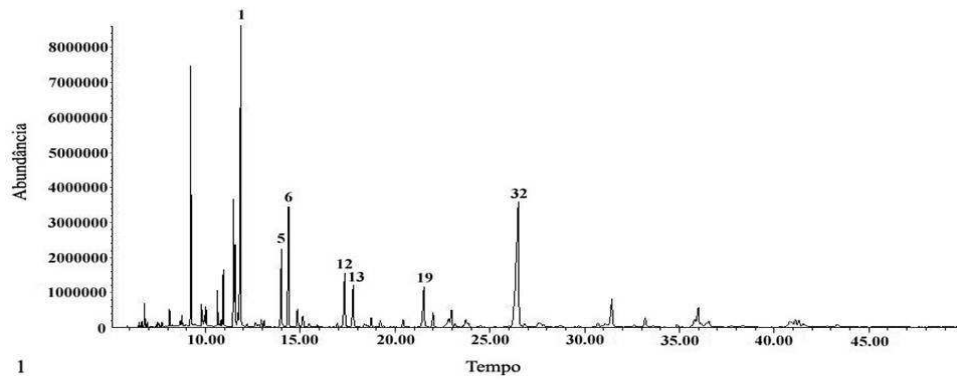
<b>20</b>	Nonacosano (C29)	1,8 ± 0,57	5,84 ± 1,27	5,59 ± 0,81	1,81 ± 0,35	2900
<b>21</b>	15-, 13-, 11-, 9-Me C29	2,37 ± 0,64	1,72 ± 0,27	0,96 ± 0,83	2,52 ± 0,49	2934
<b>22</b>	7-Me C29	2,73 ± 0,74	1,04 ± 0,21	0,7 ± 0,61	0,22 ± 0,3	2941
<b>23</b>	5-Me C29	0,2 ± 0,35	-	-	-	2947
<b>24</b>	11,15-DiMe C29	-	-	-	0,2 ± 0,28	2958
<b>25</b>	3-Me C29	0,7 ± 1,21	0,28 ± 0,48	-	-	2966
<b>26</b>	Triacoteno (x-C30:1)	-	1,08 ± 0,55	-	-	2968
<b>27</b>	7,12-, 7,10-DiMe C29	0,78 ± 1,35	-	-	0,51 ± 0,02	2971
<b>28</b>	5-14-, 5,12-, 5,10-DiMe C29	0,21 ± 0,36	-	-	0,6 ± 0,02	2981
<b>29</b>	Triacotano (C30)	-	-	1,04 ± 0,91	-	3000
<b>30</b>	Alcano ramificado desconhecido	0,58 ± 1	0,12 ± 0,2	-	-	3008
<b>31</b>	16-, 15-, 14-, 13-, 10-, 8-Me C30	-	-	-	0,19 ± 0,27	3034
<b>32</b>	Hentricoteno (x-C31:1)	25,93 ± 3,62	23,55 ± 2,69	32,23 ± 1,3	6,58 ± 0,66	3096
<b>33</b>	Hentriacontano (C31)	-	2,2 ± 0,44	1,15 ± 1	0,8 ± 0,21	3100
<b>34</b>	15-, 13-, 11-, 9-, 7-Me C31	1,01 ± 0,2	2,52 ± 0,65	1,25 ± 1,12	5,26 ± 0,53	3135
<b>35</b>	13,17-, 11,15-DiMe C31	-	0,16 ± 0,28	-	1,19 ± 0,38	3156
<b>36</b>	7,17-, 7,15-, 7,13-DiMe C31	-	-	-	0,59 ± 0,02	3168
<b>37</b>	Dotriaconteno (x-C32:1)	-	0,15 ± 0,26	-	-	3171
<b>38</b>	5,17-DiMe C31	-	-	-	0,18 ± 0,25	3177
<b>39</b>	Dotriacontano (C32)	-	-	-	0,49 ± 0,06	3200
<b>40</b>	Alcano ramificado desconhecido	-	-	-	0,88 ± 0,06	3228
<b>41</b>	Tritriacontadieno (x-C33:2)	1,01 ± 1,75	1,25 ± 0,1	0,4 ± 0,69	-	3250
<b>42</b>	Alcano ramificado	-	-	-	0,68 ± 0,03	3252
<b>43</b>	Tritriacontadieno (x-C33:2)	1,48 ± 1,37	0,77 ± 0,04	0,37 ± 0,65	-	3257
<b>44</b>	Alcano ramificado desconhecido	0,5 ± 0,86	-	-	-	3265
<b>45</b>	Tritriaconteno (x-C33:1)	0,22 ± 0,39	-	0,32 ± 0,56	-	3265

Tabela 1: Continuação

<b>46</b>	Tritriconteno (x-C33:1)	3,92 ± 0,36	5,02 ± 0,81	6,35 ± 0,75	1,71 ± 0,06	3280
<b>47</b>	Tritriacontano (C33)	-	0,97 ± 0,09	1,21 ± 2,1	0,52 ± 0,08	3300
<b>48</b>	17-, 15-, 13-, 11-Me C33	-	2,25 ± 0,74	0,83 ± 0,73	11,09 ± 0,13	3342
<b>49</b>	15,19-, 13,17-, 11,15-DiMe C33	0,46 ± 0,79	0,57 ± 0,49	-	8,13 ± 0,18	3365
<b>50</b>	Alcano ramificado desconhecido	-	-	-	0,45 ± 0,01	3381
<b>51</b>	Alcano ramificado desconhecido	0,39 ± 0,67	-	-	0,37	3392
<b>52</b>	Triacontanil acetato	-	-	-	0,57 ± 0,06	3417
<b>53</b>	Alcano ramificado desconhecido	-	-	-	1,8 ± 0,08	3432
<b>54</b>	Alcano ramificado desconhecido	-	-	-	1,18 ± 0,08	3455
<b>55</b>	Pentatriacontadieno (x-C35:2)	4,57 ± 4,59	1,03 ± 0,27	-	-	3455
<b>56</b>	Pentatriacontadieno (x-C35:2)	3,01 ± 1,62	2,05 ± 0,86	1,37 ± 1,22	-	3461
<b>57</b>	Pentatriacontadieno (x-C35:2)	0,45 ± 0,78	0,18 ± 0,31	-	-	3466
<b>58</b>	Pentatriconteno (x-C35:1)	-	0,15 ± 0,27	-	-	3466
<b>59</b>	Pentatriconteno (x-C35:1)	0,89 ± 0,86	0,28 ± 0,48	0,32 ± 0,56	-	3481
<b>60</b>	17-, 15-, 13-, 11-Me C35	-	0,49 ± 0,42	0,97 ± 0,84	10,55 ± 1,64	3542
<b>61</b>	15,19-, 13,17-, 11,15-DiMe C35	-	0,13 ± 0,23	1,17 ± 2,03	8,43 ± 1,08	3567
<b>62</b>	Alcano ramificado desconhecido	-	-	-	0,95 ± 0,16	3635
<b>63</b>	Alcano ramificado desconhecido	-	-	-	0,65 ± 0,09	3658
<b>64</b>	Heptatriacontadieno (x-C37:2)	1,49 ± 0,27	0,7 ± 0,62	0,38 ± 0,65	-	
<b>65</b>	Heptatriacontadieno (x-C37:2)	0,66 ± 0,57	0,12 ± 0,21	-	-	
<b>66</b>	Heptatriacontadieno (x-C37:2)	0,65 ± 0,59	0,17 ± 0,29	-	-	
<b>67</b>	Heptatriacontadieno (x-C37:2)	0,49 ± 0,84	0,21 ± 0,36	-	-	
<b>68</b>	Heptatriacontadieno (x-C37:2)	0,45 ± 0,78	0,15 ± 0,27	-	-	
<b>69</b>	Heptatriacontadieno (x-C37:2)	0,36 ± 0,62	-	-	-	
<b>70</b>	17-, 15-, 13-, 11-Me C37	-	0,45 ± 0,79	-	2,52 ± 0,52	3742

Tabela 1: Continuação

<b>71</b>	15,19-, 13,17-, 11,15-DiMe C37	-	1,33 ± 2,31	3,25 ± 2,9	3,51 ± 0,75	3765
<b>72</b>	15,19-, 13,17-, 11,15-DiMe C39	-	-	-	0,75 ± 0,09	3967
<b>73</b>	Alcanos desconhecidos	1,37 ± 1,65	6,64 ± 2,61	4,07 ± 3,55	-	-



Figuras 1 - 4: Cromatogramas dos extratos de hidrocarbonetos cuticulares de rainhas de *Melipona scutellaris*. 1 – Rainha recém-emergida. 2 - Rainha virgem com oito dias de idade na presença da rainha fisogástrica. 3 - Rainha virgem com oito dias de idade na ausência da rainha fisogástrica. 4 - Rainha fisogástrica.

Tabela 2 – Resultado dos testes para verificação de homogeneidade de variâncias.  
 \*, significativo; ns, não significativo.

Composto	Teste		
	Bartlett	Levene	Kochan
Tricosano (C <sub>23</sub> )	*	ns	*
Pentacoseno (x-C <sub>25:1</sub> )	ns	ns	ns
Pentacosane (C <sub>25</sub> )	ns	ns	ns
13-, 11-Me C <sub>25</sub>	ns	ns	ns
5-Me (C <sub>25</sub> )	ns	ns	ns
Heptacoseno (x-C <sub>27:1</sub> )	ns	ns	ns
Heptacosane (C <sub>27</sub> )	ns	ns	ns
13-, 11-, 9-Me C <sub>27</sub>	ns	ns	ns
Nonacoseno (x-C <sub>29:1</sub> )	ns	ns	ns
Nonacosano (C <sub>29</sub> )	ns	ns	ns
15-, 13-, 11-, 9-Me C <sub>29</sub>	ns	ns	ns
7-Me C <sub>29</sub>	ns	ns	ns
Hentriaconteno (x-C <sub>31:1</sub> )	ns	ns	ns
Hentriacontano (C <sub>31</sub> )	ns	ns	ns
15-, 13-, 11-, 9-, 7-Me C <sub>31</sub>	ns	ns	ns
Tritriacontadieno (x-C <sub>33:2</sub> )	*	ns	*
Tritriacontadieno (x-C <sub>33:2</sub> )	*	ns	*
Tritriaconteno (x-C <sub>33:1</sub> )	ns	ns	ns
Tritriacontano (C <sub>33</sub> )	*	ns	*
17-, 15-, 13-, 11-Me C <sub>33</sub>	ns	ns	ns
15,19-, 13,17-, 11,15-DiMe C <sub>33</sub>	ns	ns	ns
Pentatriacontadieno (x-C <sub>35:2</sub> )	*	ns	*
Pentatriacontadieno (x-C <sub>35:2</sub> )	ns	ns	ns
Pentatriaconteno (x-C <sub>35:1</sub> )	ns	ns	ns
17-, 15-, 13-, 11-Me C <sub>35</sub>	ns	ns	ns
15,19-, 13,17-, 11,15-DiMe C <sub>35</sub>	*	ns	*
Heptatriacontadieno (x-C <sub>37:2</sub> )	ns	ns	ns
15,19-, 13,17-, 11,15-DiMe C <sub>37</sub>	ns	ns	ns

Tabela 3 – Coeficientes de cada componente principal gerado na análise.

Composto	Coeficientes		
	CP1	CP2	CP3
Pentacoseno (x-C <sub>25:1</sub> )	0,067	0,217	-0,078
Pentacosano (C <sub>25</sub> )	-0,022	-0,329	0,043
13-, 11-Me C <sub>25</sub>	-0,076	0,058	0,029
5-Me C <sub>25</sub>	-0,003	0,108	-0,039
Heptacoseno (x-C <sub>27:1</sub> )	0,190	-0,341	-0,139
Heptacosano (C <sub>27</sub> )	0,151	-0,576	-0,285
13-, 11-, 9-Me C <sub>27</sub>	-0,039	-0,028	-0,073
Nonacoseno (x-C <sub>29:1</sub> )	0,135	-0,069	-0,098
Nonacosano (C <sub>29</sub> )	0,093	-0,355	-0,140
15-, 13-, 11-, 9-Me C <sub>29</sub>	-0,038	0,107	-0,073
7-Me C <sub>29</sub>	0,032	0,195	-0,076
Hentriaconteno (x-C <sub>31:1</sub> )	0,763	0,059	0,475
Hentriacontano (C <sub>31</sub> )	0,004	-0,122	-0,141
15-, 13-, 11-, 9-, 7-Me C <sub>31</sub>	-0,128	-0,075	-0,040
Tritriaconteno (x-C <sub>33:1</sub> )	0,128	-0,131	0,091
17-, 15-, 13-, 11-Me C <sub>33</sub>	-0,332	-0,187	0,203
15,19-, 13,17-, 11,15-DiMe C <sub>33</sub>	-0,257	-0,052	0,220
Pentatriacontadieno (x-C <sub>35:2</sub> )	0,063	0,192	-0,055
Pentatriaconteno (x-C <sub>35:1</sub> )	0,012	0,057	-0,026
17-, 15-, 13-, 11-Me C <sub>35</sub>	-0,320	-0,119	0,410
Heptatriacontadieno (x-C <sub>37:2</sub> )	0,023	0,112	-0,062
15,19-, 13,17-, 11,15-DiMe C <sub>37</sub>	-0,032	-0,234	0,568

Tabela 4 – Agrupamento de compostos segundo os coeficientes em cada CP

Compostos CP1	Compostos CP2	Compostos CP3
13-, 11-Me C25 a	Pentacoseno (x-C25:1)	13-, 11-, 9-Me C27
Nonacoseno (x-C29:1)	Pentacosano (C25)	Hentriacontano (C31)
Hentriaconteno (x-C31:1)	5-Me C25	17-, 15-, 13-, 11-Me C35
15-, 13-, 11-, 9-, 7-Me C31	Heptacoseno (x-C27:1)	15,19-, 13,17-, 11,15-DiMe C37
17-, 15-, 13-, 11-Me C33	Heptacosano (C27)	
15,19-, 13,17-, 11,15-DiMe C33	Nonacosano (C29)	
	15-, 13-, 11-, 9-Me C29	
	7-Me C29	
	Tritriaconteno (x-C33:1)	
	Pentatriacontadieno (x-C35:2)	
	Pentatriconteno (x-C35:1)	
	Heptatriacontadieno (x-C37:2)	

Tabela 5 – Valores dos componentes principais (CP) utilizados para análise de variância e teste de médias dos hidrocarbonetos cuticulares de rainhas de *Melipona scutellaris*. RF, rainhas fisogástricas; RV8-CF, rainhas virgens com oito dias de idade na presença da rainha fisogástrica; RV8-SF, rainhas virgens com 8 dias de idade na ausência da rainha fisogástrica; RV-VE, rainhas virgens recém-emergidas.

Grupo	Tratamento	Repetições	CP1	CP2	CP3
RF	1	1	-3,54	-9,16	11,50
RF	1	2	-5,08	-10,32	12,81
RV8-CF	2	1	22,19	-8,98	12,40
RV8-CF	2	2	19,36	-14,58	5,44
RV8-CF	2	3	21,08	-11,72	5,81
RV8-SF	3	1	31,06	-15,18	14,46
RV8-SF	3	2	27,34	-12,32	13,19
RV8-SF	3	3	27,80	-9,17	11,58
RV-RE	4	1	20,21	-2,43	8,92
RV-RE	4	2	25,31	0,20	11,99
RV-RE	4	3	21,12	-4,42	8,86

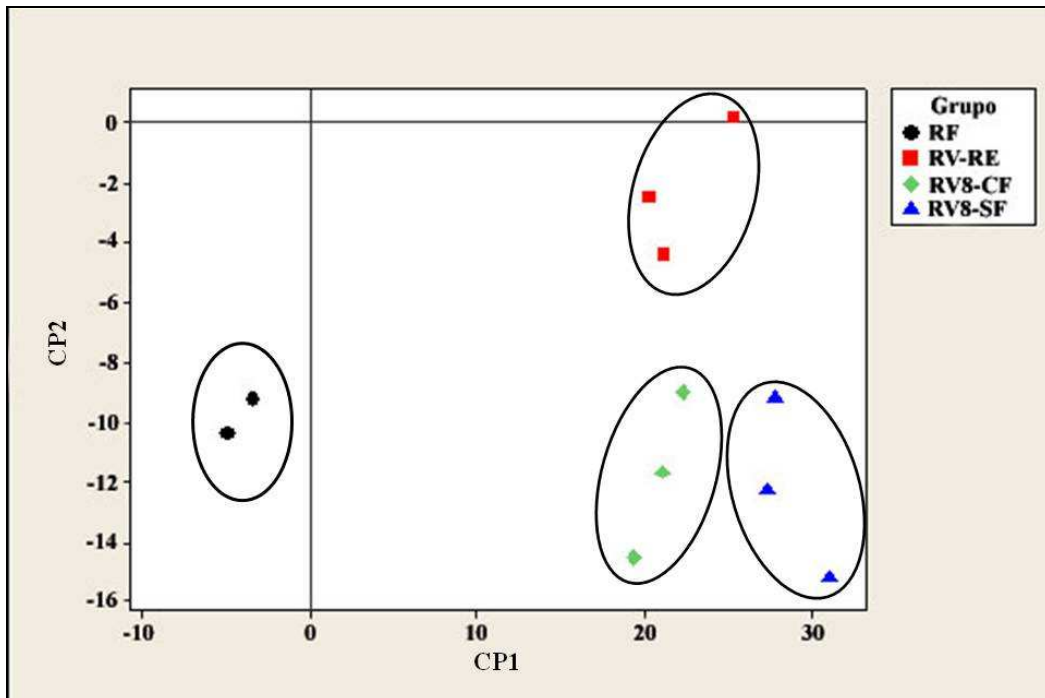


Figura 5: Resultado conjunto dos testes de médias para os componentes principais 1 e 2. RF, rainhas fisogástricas; RV-RE, rainhas virgens recém-emergidas; RV8-CF, rainhas virgens com oito dias de idade na presença da rainha fisogástrica; RV8-SF, rainhas virgens com oito dias de idade na ausência da rainha fisogástrica.

## ANEXO

### Análise de Variância

#### CP1

Fontes de Variação p-valor	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
TRAT 116.832 0.00000	3	1413.186	471.0620	
Resíduo	7	28.22375	4.0319	

Coefficiente de Variação = 10.676

#### DUNCAN

Variável = CP1 (4.031964)

TRAT Médias Comparações 5%

---

3	28.7393	A
4	22.2171	B
2	20.8826	B
1	-4.3169	C

---

### Análise de Variância

#### CP2

Fontes de Variação p-valor	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
TRAT 9.965 0.00639	3	193.0397	64.34656	
Resíduo	7	45.20025	6.457179	

Coefficiente de Variação = 28.487

#### DUNCAN

Variável = CP2 (6.457179)

TRAT Médias Comparações 5%

---

4	-2.2212	A
1	-9.7436	B
2	-11.7662	B
3	-12.2244	B

---

**CP3**

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
TRAT	3	46.66119	15.55373	
2.585	0.13574			
Resíduo	7	42.11954	6.01707	

Coeficiente de Variação = 23.063

## CAPÍTULO 3

### HISTOLOGIA E ULTRA-ESTRUTURA DAS GLÂNDULAS MANDIBULARES E INTRAMANDIBULARES DE RAINHAS DE *Melipona scutellaris* (HYMENOPTERA, APIDAE) COM DIFERENTES IDADES

#### INTRODUÇÃO

Dentre as glândulas que formam o sistema salivar dos insetos, as glândulas mandibulares e intramandibulares estão presentes nos adultos de todas as espécies dos himenópteros (Abdalla & Cruz-Landim, 2002).

As glândulas mandibulares são órgãos de origem ectodérmica divididos em duas regiões, a região secretora e o reservatório (Cruz-Landim, 1967). As células secretoras pertencem à classe III, ou seja, estas células não estão incorporadas na epiderme, mas são providas de um canal que a liga a um poro na cutícula por onde a secreção é descarregada. A membrana das células secretoras da classe III produz uma invaginação que cria um espaço, aparentemente intracelular, para onde a célula secreta uma cutícula. Este espaço criado tem sido chamado de canalículo intracelular, embora o esteja fora da célula (Noirot & Quenedey, 1974, 1991). A forma, o tamanho, a distribuição e a quantidade de células secretoras das glândulas mandibulares diferem entre as espécies, castas e sexo de abelhas. (Snodgrass, 1956; Costa & Cruz-Landim, 1977; Cruz-Landim & Abdalla, 2002).

A função das glândulas mandibulares não está completamente esclarecida nos Meliponini, embora em Apini alguns estudos indiquem que a secreção das glândulas mandibulares esteja envolvida na comunicação química. Em *A. mellifera*, um dos principais compostos produzido pelas glândulas mandibulares é o ácido 9-oxidecenóico (9 ODA), responsável pela inibição do desenvolvimento dos ovários das operárias e do comportamento de construção de células para criação de rainha; além de ser um atraente sexual para os machos durante o vôo nupcial (Kaatz et al., 1992; Pankiw et al., 1994; Engels et al., 1997; Miller & Ratnieks, 2001).

As glândulas intramandibulares dos meliponíneos são constituídas de células secretoras da classe III, localizadas no interior da mandíbula, mas estão ausentes em *A. mellifera*. Segundo Costa-Leonardo (1967), essas glândulas podem participar da produção de feromônios. Além das células secretoras no interior da mandíbula, as células epidérmicas, cobertas na sua face apical pela cutícula tegumentar, em determinadas fases da vida das castas femininas tornam-se secretoras, sendo caracterizadas como glândulas da classe I (Cruz-Landim, 1967) na qual a secreção é eliminada diretamente pelos poros cuticulares (Noirot & Quenedey, 1974).

Considerando que em *M. scutellaris* as rainhas virgens a partir de cinco dias de idade adulta são mortas pelas operárias (Capítulo 1) e que os hidrocarbonetos cuticulares tem participação no reconhecimento do estado reprodutivo das rainhas (Capítulo 2), esse trabalho teve como objetivo avaliar a morfologia das glândulas mandibulares e intramandibulares em rainhas virgens de *M. scutellaris* com diferentes idades para testar a hipótese que estas glândulas participam da produção de hidrocarbonetos cuticulares nas rainhas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais**

Os exemplares de *M. scutellaris* foram obtidos em colônias instaladas no Apiário da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (20°45'14 N; 42°52'55" W), Minas Gerais, Brasil. Duas colônias de *M. scutellaris* foram mantidas em caixas de madeira com baixa luminosidade (tampada com vidro recoberto com papel celofane vermelho) e em temperatura ambiente de onde foram retirados favos de cria nascentes. Esses favos foram mantidos a  $28 \pm 1$  °C e observados diariamente para obtenção de rainhas virgens recém-emergidas.

Para obtenção de rainhas com sete dias de idade, duas rainhas recém-emergidas foram inseridas em gaiolas de grade de metal com operárias nutridoras, pólen e mel *ad lib.*. Essas gaiolas foram introduzidas nas colônias de onde os indivíduos foram obtidos até atingirem sete dias de idade. Essa metodologia foi utilizada porque, a partir de cinco dias de idade, as operárias campeiras

demonstram um comportamento agressivo, atacando as rainhas virgens, levando-as à morte (Capítulo 1).

### **Microscopia de Luz**

Duas rainhas virgens recém-emergidas e duas rainhas virgens com sete dias de idade foram crio-anestesiadas por um minuto a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sendo logo em seguida decapitadas e as mandíbulas e glândulas mandibulares foram dissecadas e transferidas para solução de Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967) por duas horas. Em seguida as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol e embebidas em historesina (Leica, Heidelberg, Germany). Secções de  $4\ \mu\text{m}$  de espessura foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina. Algumas secções foram submetidas aos testes histoquímicos de P.A.S. para evidenciar polissacarídeos e glicoconjugados e teste de mercúrio-bromofenol para evidenciar proteínas totais (Pearse, 1985).

### **Morfometria**

Dez secções histológicas das glândulas mandibulares e intramandibulares das rainhas recém-emergidas e das rainhas com sete dias de idade foram selecionadas aleatoriamente, das quais foram medidas a área celular total, a área do núcleo e a relação núcleo/citoplasma de dez células das glândulas mandibular e intramandibular. As medidas foram obtidas com auxílio do software Image Pro-Plus® (Media Cybernetics Inc.). As medidas foram submetidas ao teste T, teste de comparação das médias ao nível de significância de 5%, para verificar se existem diferenças entre as células secretoras das glândulas mandibulares e intramandibulares de rainhas virgens recém-emergidas e com sete dias de idade, sendo as análises conduzidas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Minitab® (Minitab Inc., USA) versão 14.

### **Ultra-estrutura**

As glândulas foram dissecadas como descrito acima e transferidas para glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M em períodos superiores a vinte e quatro horas. As amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio por duas

horas em temperatura ambiente, novamente lavadas em tampão, desidratadas em série com concentrações crescentes de acetona e incluídas em resina Spurr®. Secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila 1% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e posteriormente analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109 do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

## RESULTADOS

As glândulas mandibulares das rainhas virgens de *M. scutellaris* são compostas por células secretoras esféricas (Figura 1A). As células das glândulas mandibulares de rainhas virgens recém-emergidas apresentaram área celular total de  $300,08 \pm 72,21 \mu\text{m}^2$ , enquanto as células das glândulas mandibulares de rainhas virgens com sete dias de idade apresentaram área total de  $394,32 \pm 65,94 \mu\text{m}^2$ , sendo que estas últimas apresentaram menor relação núcleo/citoplasma (Tabela 1). O resultado do teste T comprova que as células secretoras das glândulas das rainhas virgens com diferentes idades apresentam tamanhos diferentes ( $P < 0,05$ ).

As análises histoquímicas não demonstraram diferenças entre rainhas virgens recém-emergidas e com sete dias de idade. O teste de mercúrio-bromofenol foi fortemente positivo para as glândulas mandibulares das duas rainhas analisadas (Figura 1B) e o citoplasma das células secretoras das glândulas mandibulares foi corado de forma heterogênea quando submetido ao teste de P.A.S (Figura 1C)

As células secretoras da classe III da mandíbula foram localizadas sob a epiderme, no interior da mandíbula (Figura 2A). As células secretoras da glândula intramandibular das rainhas virgens recém-emergidas possuíram área celular de  $238,7 \pm 33,58 \mu\text{m}^2$ , enquanto as rainhas virgens com sete dias de idade apresentaram  $179,47 \pm 18,80 \mu\text{m}^2$ , porém em ambas as rainhas os valores da relação núcleo/citoplasma foram próximos. As células secretoras de rainhas virgens recém-emergidas apresentaram-se esféricas, enquanto que as células de rainhas virgens com sete dias de idade apresentaram-se com formato irregular (Figura 2A, 2B e Tabela 2). As células secretoras das glândulas intramandibulares

também apresentam tamanhos diferentes de acordo com a idade das rainhas ( $p < 0,05$ ).

As análises histoquímicas das células das glândulas intramandibulares da classe III das rainhas virgens indicaram que seus citoplasmas foram fracamente positivos ao teste com mercúrio-bromofenol (Figura 2C) e ao testes de P.A.S (Figura 2D).

O epitélio de revestimento associado à face convexa da mandíbula das rainhas virgens recém-emergidas e com sete dias de idade é composto por células altas com núcleos alongados acompanhando o formato da célula com predomínio de cromatina descondensada (Figura 3A). O epitélio da mandíbula apresentou-se fracamente positivo ao teste mercúrio-bromofenol (Figura 3B) e fracamente positivo ao teste de P.A.S, prevalecendo a marcação em sua porção basal (Figura 3C).

Análises ultra-estruturais mostraram que as glândulas mandibulares das rainhas virgens recém-emergidas e com sete dias de idade são compostas por células com núcleos grandes ricos em cromatina descondensada (Figura 4A) e o citoplasma rico em retículo endoplasmático liso e mitocôndrias (Figuras 4B, 5A, 5B). Além disso, canalículos intracelulares foram observados, característica que inclui essas glândulas na classe III (Figuras 4A e 5B).

Análises ultra-estruturais das células secretoras da classe III da glândula intramandibular mostraram que essas células apresentam um retículo endoplasmático liso bem desenvolvido assim como muitas mitocôndrias com forma variada (Figura 6).

As células do epitélio de revestimento associadas à face convexa da mandíbula têm na porção mediana, citoplasma rico em retículo endoplasmático liso (Figura 7A). A porção basal dessas células apresentou invaginações da membrana plasmática associadas a mitocôndrias (Figura 7B). A porção apical das células do epitélio mandibular apresentou a membrana plasmática com inúmeras projeções irregulares formando um extenso labirinto no espaço subcuticular (Figura 8).

## DISCUSSÃO

As glândulas mandibulares de rainhas virgens de *M. scutellaris* com idades diferentes apresentaram células secretoras com tamanhos diferentes, sendo mais desenvolvidas em rainhas virgens no período no qual são agredidas pelas operárias (a partir de cinco dias de idade), o que pode sugerir que as glândulas mandibulares em rainhas virgens possam participar da comunicação química em *M. scutellaris*. Em rainhas virgens de *Scaptotrigona postica*, a secreção das glândulas mandibulares é utilizada como comunicação com os machos durante o vôo nupcial (Velthuis, 1997; Gracioli-Vitti, 2004).

As análises ultra-estruturais não mostraram diferenças entre células secretoras das glândulas mandibulares das rainhas virgens recém-emergidas e com sete dias de idade de *M. scutellaris*. Essas células possuem núcleos esféricos com cromatina descondensada e nucléolo evidente bem como citoplasma com abundância de retículo endoplasmático liso e mitocôndrias. Essas características indicam que as células secretoras das glândulas mandibulares das rainhas virgens de *M. scutellaris* secretam compostos de natureza lipídica. Entretanto, não descartamos que a secreção apresente glicoconjugados, já que o citoplasma dessas células foi positivo ao teste de P.A.S. Em *M. bicolor*, as células secretoras das glândulas mandibulares de rainhas virgens apresentam riqueza de retículo endoplasmático granular e complexo de Golgi, o que indica que a secreção dessas células é de natureza protéica ou glicoprotéica, enquanto as células secretoras das rainhas fisogástricas apresentam riqueza de retículo endoplasmático liso, o que indica que a secreção dessas células é de natureza lipídica (Gracioli et al., 2004). Assim, as glândulas mandibulares de rainhas virgens de *M. scutellaris* são mais semelhantes às glândulas mandibulares de rainhas fisogástricas do que de rainhas virgens de *M. bicolor*. Alguns trabalhos com insetos sociais sugerem que a secreção das glândulas mandibulares de rainhas pode conter feromônios e que essa secreção apresenta compostos com caráter lipídico (Topoff & Greenber, 1988; Cruz-Landim & Reginato, 2001; Grasso et al., 2003; Cahlíková et al., 2004; Gracioli et al., 2004; Gracioli-Vitti et al., 2004; Cruz-López et al., 2005). Como as células das glândulas mandibulares de *M. scutellaris* apresentaram características na sua ultra-estrutura que indicam a síntese de compostos de caráter lipídico,

acreditamos que esses compostos possam contribuir com a comunicação química na colônia de forma semelhante ao que ocorre em outros insetos sociais.

Nas mandíbulas de rainhas virgens de *M. scutellaris* foram encontradas dois tipos de glândulas intramandibulares: células da classe I e células da classe III segundo classificação de Noirot & Quennedey (1974, 1991).

As células secretoras da glândula intramandibular da classe III de rainhas virgens recém-emergidas e com sete dias de idade apresentaram morfologia diferente. Nas rainhas virgens recém-emergidas as células são esféricas, enquanto que nas rainhas com sete dias de idade a morfologia é irregular, o que sugere que estas glândulas estariam em processo de degeneração com o envelhecimento das rainhas, porém, nenhum sinal de degeneração, tal como núcleo picnótico e corpos apoptóticos, foi observado nas análises ultra-estruturais. Apesar da morfologia diferente, as células secretoras de ambas as idades de rainhas virgens mostraram relação núcleo/citoplasma próxima, sugerindo que não há diferenças na quantidade de secreção produzida, pois a área das células glandulares está correlacionada com a quantidade de secreção, como sugerido por Peters et al., (2010).

As análises ultra-estruturais das células secretoras da glândula intramandibular da classe III de rainhas virgens de *M. scutellaris* em ambas as idades estudadas demonstraram que essas células são ricas em retículo endoplasmático liso o que sugere que a secreção dessas glândulas tem caráter lipídico. Essas células supostamente são responsáveis pela produção de compostos lubrificantes das mandíbulas e outras substâncias relacionadas com a construção do ninho, tarefas executadas pelas operárias (Nedel, 1960; Santos et al., 2009), o que parece não ser o caso em rainhas, uma vez que esta casta não participa destas atividades no ninho. Entretanto, Costa-Leonardo (1978) sugere que o produto de secreção das glândulas intramandibulares da classe III pode participar da comunicação química da colônia.

O epitélio secretor (glândula da classe I) da mandíbula de rainhas de *M. scutellaris* é constituído de células colunares ricas em retículo endoplasmático liso. Segundo Santos et al. (2010) o epitélio secretor das rainhas é mais

desenvolvido nas rainhas do que nas operárias de *M. scutellaris*. Esse epitélio hipertrofiado também foi encontrado em rainhas e operárias de outras espécies do gênero *Melipona*, *Scaptotrigona*, *Plebeia* e *Schwarziana* (Costa-Leonardo, 1978; Santos et al., 2009). Segundo Santos et al. (2009), o epitélio secretor da mandíbula de operárias de *Plebeia emerina* com idade de 20 à 30 dias de idade adulta indica que este epitélio auxilie na manipulação de própolis. Como o epitélio de rainhas de *M. scutellaris* também foi hipertrofiado com riqueza em retículo liso, sugerimos que essas células também participem da produção de feromônios. A produção de alomônios pelas glândulas intramandibulares do tipo I foi sugerida para ocorrer na formiga *Pyramica membranifera* (Billen & Espadaler, 2002).

Na região basal das células do epitélio secretor, as invaginações da membrana plasmática associadas às mitocôndrias sugerem que esse epitélio participe de transporte substâncias. Além disso, análises histoquímicas demonstraram grânulos P.A.S positivos, o que sugere que esses grânulos sejam moléculas de glicogênio utilizadas como fonte de energia para tal transporte.

## **CONCLUSÃO**

As glândulas mandibulares e intramandibulares de rainhas de *M. scutellaris* apresentaram características morfológicas que indicam a síntese de compostos de natureza lipídica, possivelmente envolvidos na comunicação química destas.

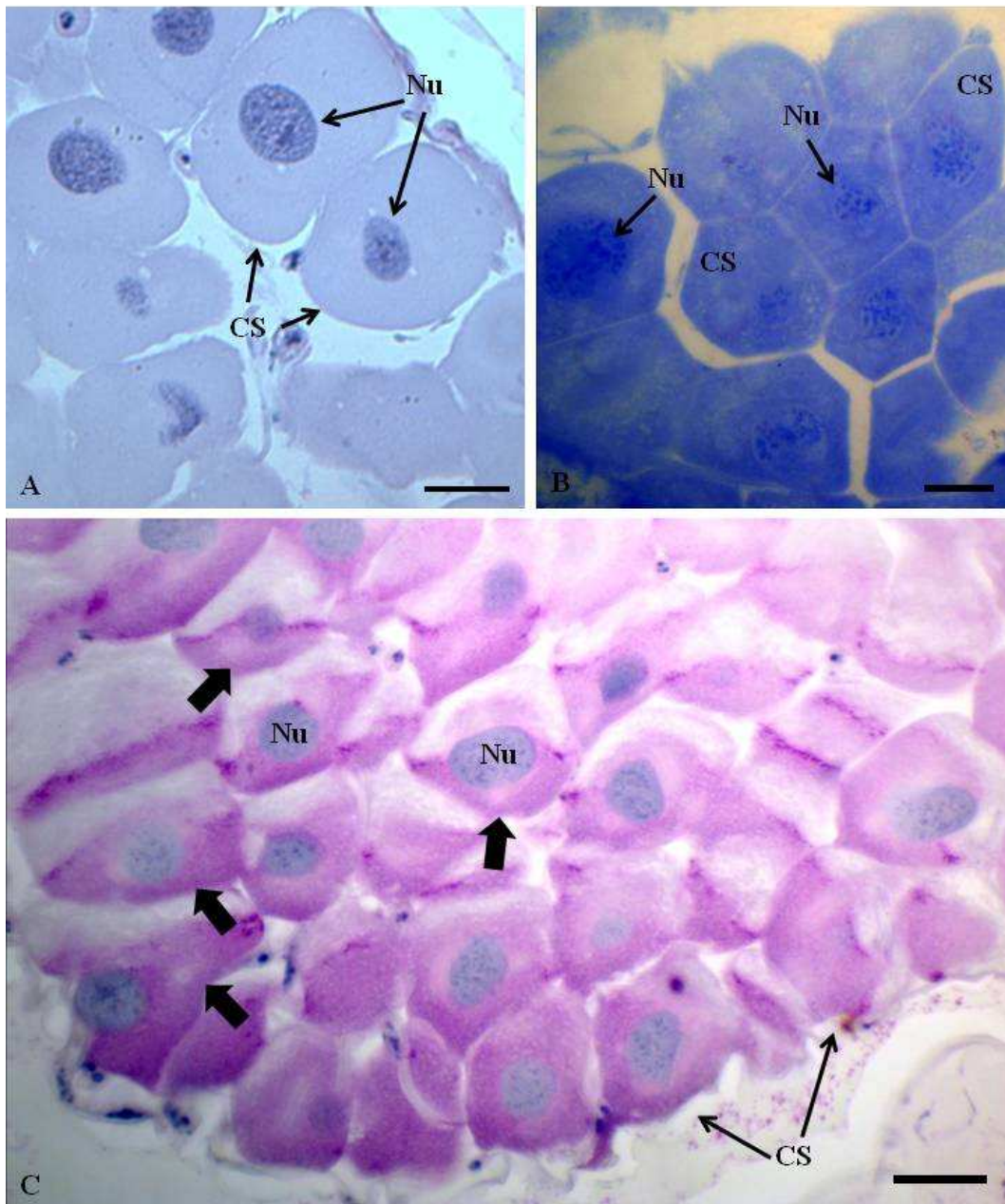


Figura 1 - Secção histológica da glândula mandibular de rainha virgem recém-emergida de *M.scutellaris*. A – Células secretoras (CS) mostrando núcleos (Nu) bem desenvolvidos e citoplasmas homogêneos. Hematoxilina-Eosina. B – Células secretoras (CS) submetidas ao teste de mercúrio-bromofenol mostrando citoplasmas fortemente positivos. C – Células secretoras (CS) submetidas ao teste de P.A.S mostrando citoplasmas com regiões positivas (setas largas). Barras: 30 $\mu$ m

Tabela 1 – Medidas (média  $\pm$  dp) das células secretoras da glândula mandibular de rainhas virgens de *Melipona scutellaris* com diferentes idades.

Rainhas	Área Celular Total ( $\mu\text{m}^2$ )	Área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ )	Área citoplasmática ( $\mu\text{m}^2$ )	Relação Núcleo/Citoplasma
Recém-emergida	300,1 $\pm$ 72,2	66,5 $\pm$ 17,7	233,6 $\pm$ 71,1	0,31 $\pm$ 0,3
Sete dias de vida	394,3 $\pm$ 65,9	61,1 $\pm$ 18	333,2 $\pm$ 65,3	0,191 $\pm$ 0,1

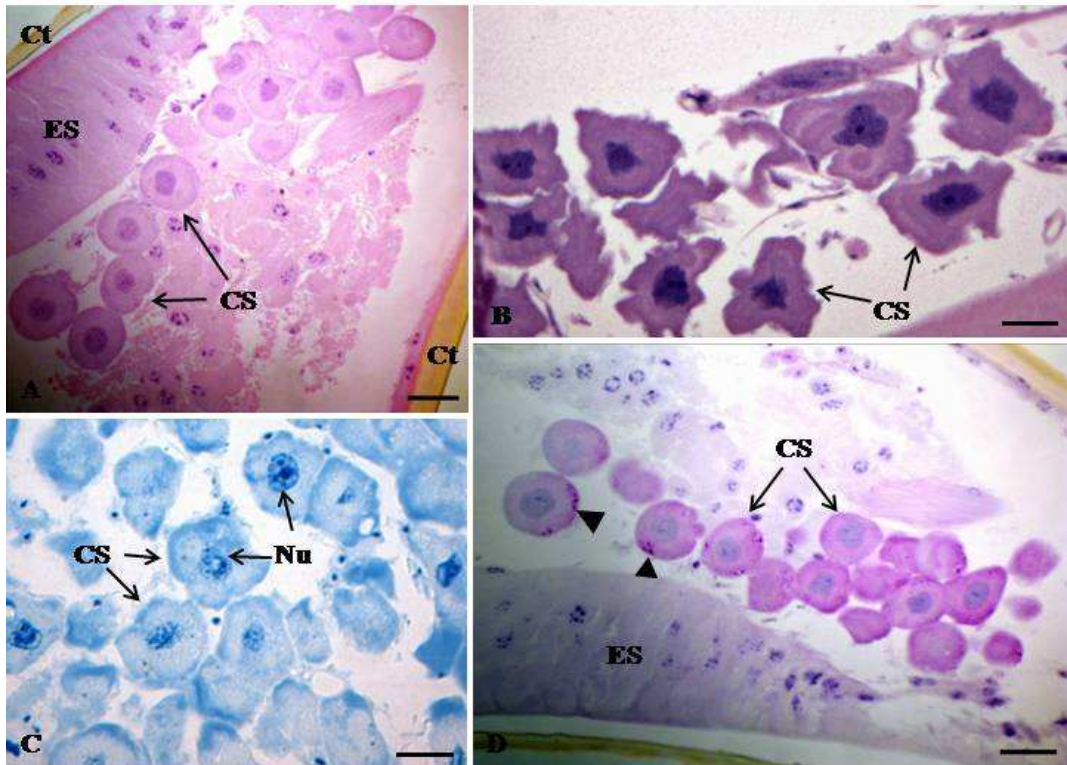


Figura 2 – Secções histológicas das glândulas intramandibulares de rainhas virgens de *M. scutellaris*. A – Rainha virgem recém-emergida mostrando células secretoras da classe III (CS) esféricas e epitélio secretor (ES). Hematoxilina-Eosina. Barra: 30µm. B – Rainha virgem com sete dias de idade mostrando células secretoras da classe III (CS) com forma irregular. Hematoxilina-Eosina. Barra: 30µm. C – Rainha virgem recém-emergida mostrando células secretoras da classe III (CS) com fraca reação positiva no citoplasma ao teste de mercúrio-bromofenol. Barra: 20µm. D – Rainha virgem recém-emergida mostrando fraca reação ao teste de P.A.S (pontas de seta) nas células secretoras da classe III (CS) e no epitélio secretor (ES). Barra: 30µm.

Tabela 2 – Medidas (média  $\pm$  dp) das glândulas da classe III presentes no interior da mandíbula de *Melipona scutellaris*.

Rainhas	Área Celular Total ( $\mu\text{m}^2$ )	Área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ )	Área citoplasmática ( $\mu\text{m}^2$ )	Relação Núcleo/Citoplasma
Recém-emergida	238,7 $\pm$ 33,6	41,5 $\pm$ 15,3	197,1 $\pm$ 32,4	0,2 $\pm$ 0,1
Sete dias de idade	179,5 $\pm$ 18,8	29,7 $\pm$ 4,5	149,7 $\pm$ 19,1	0,2 $\pm$ 0,04

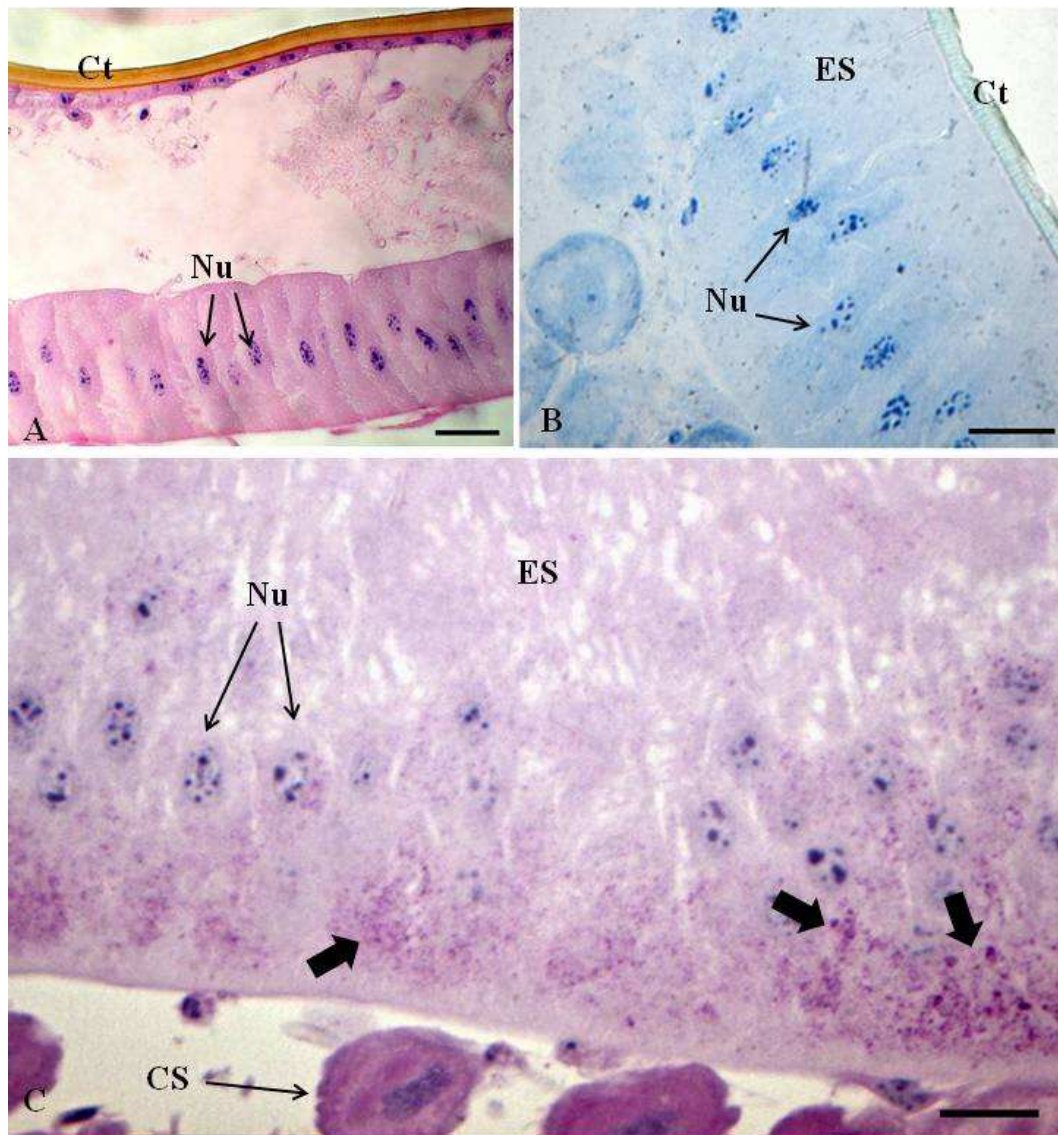


Figura 3 – Secções histológicas da glândula intramandibular da classe I de rainha virgem de *M. scutellaris*. A – Rainha virgem recém-emergida mostrando epitélio secretor (ES) da mandíbula formado por células colunares com núcleos (Nu) bem desenvolvidos. Hematoxilina-Eosina. Barras: 30µm. B) Rainha virgem recém-emergida mostrando fraca reação do citoplasma ao teste de mercúrio-bromofenol. Barra: 20µm. C – Rainha virgem com sete dias de idade mostrando reação positiva (setas largas) na porção basal das células secretoras ao teste de P.A.S. Barra: 30µm. Ct, cutícula; Cs, células secretoras.

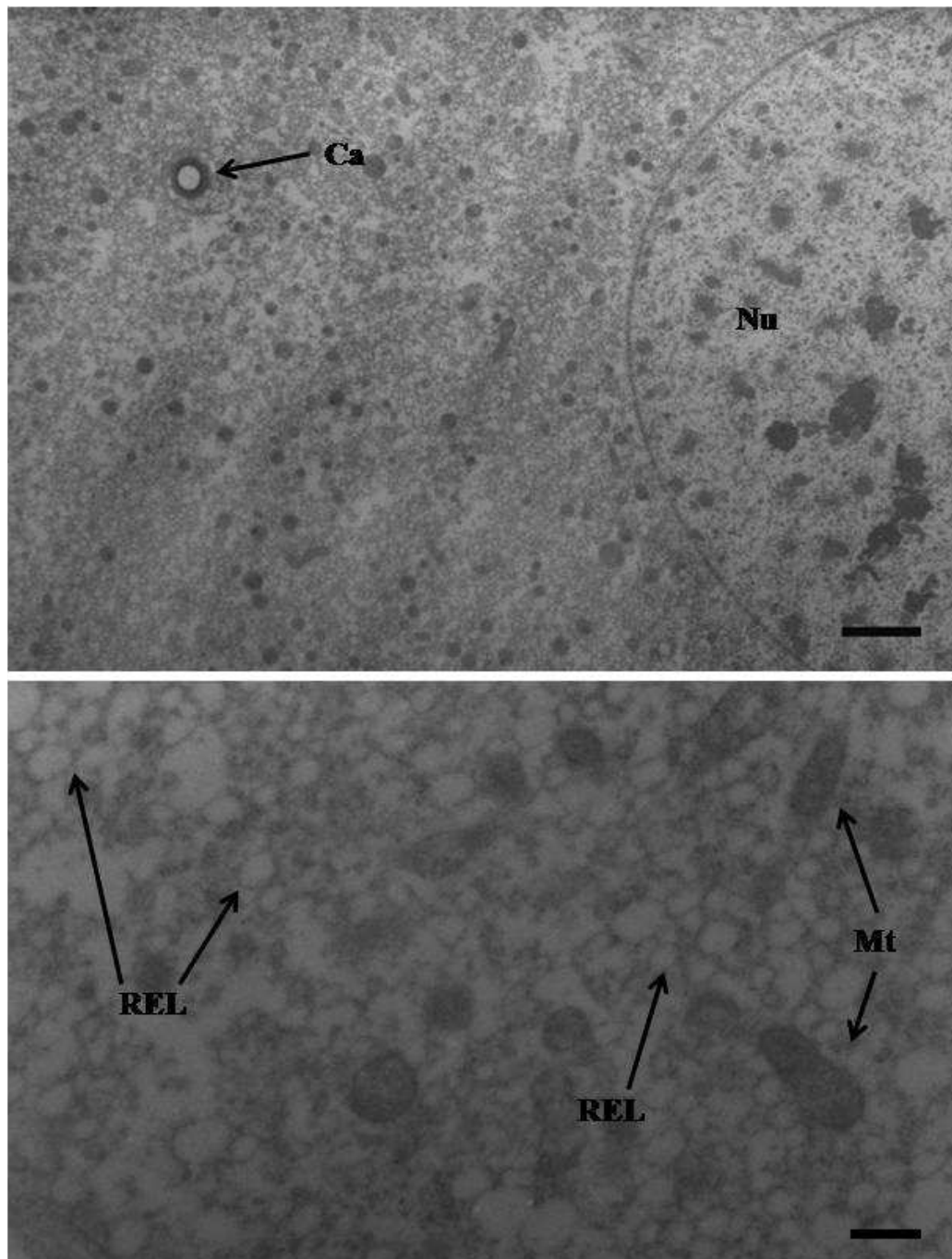


Figura 4 - Micrografia eletrônica de transmissão da célula secretora da glândula mandibular de rainha virgem recém-emergida de *M. scutellaris*. A - Célula secretora mostrando núcleo (Nu) com predomínio de cromatina descondensada e canal coletor (Ca) no citoplasma. Barra: 5 $\mu$ m. B - Detalhe do citoplasma com retículo endoplasmático liso (REL) e mitocôndrias (Mt). Barra: 1 $\mu$ m.

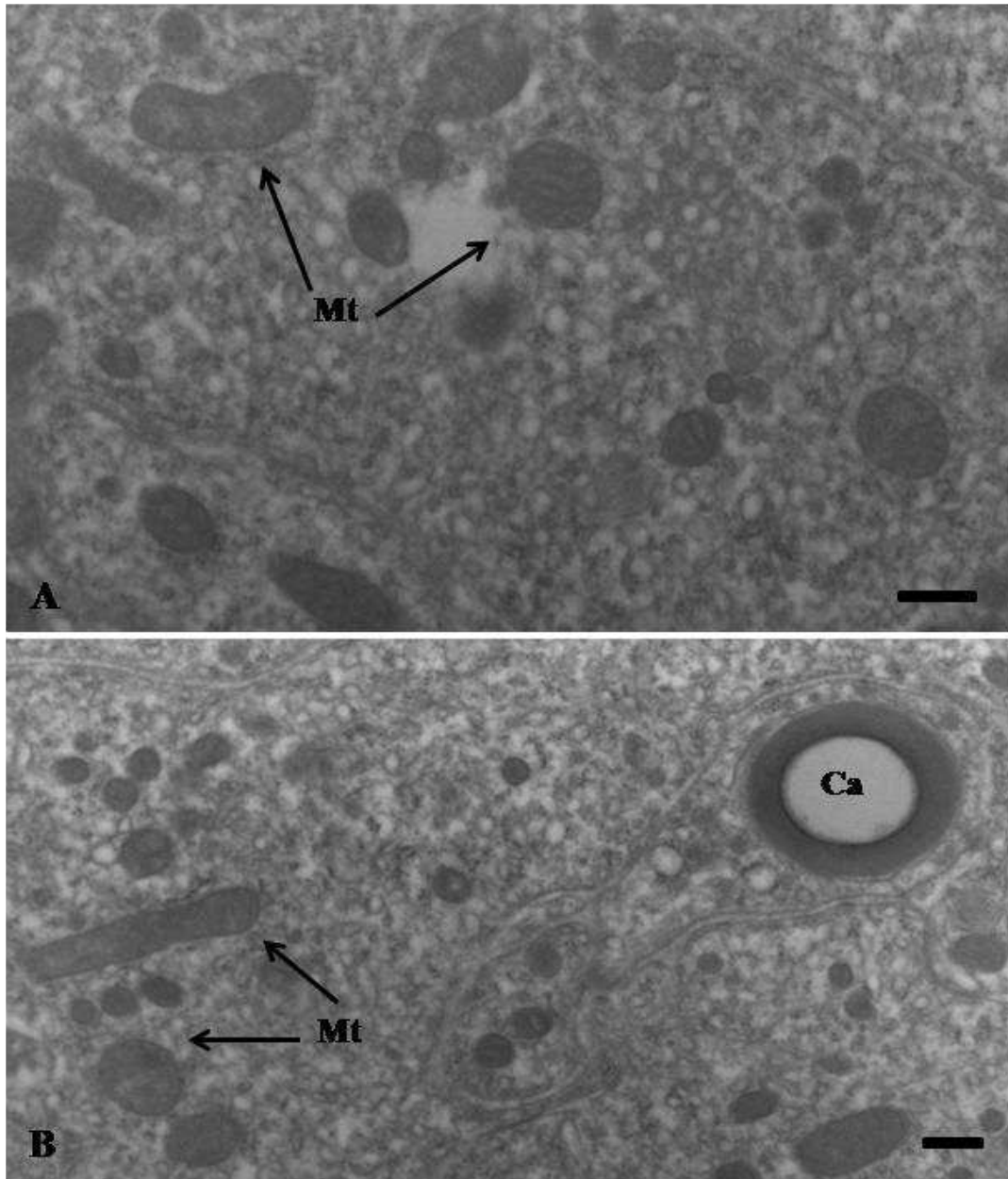


Figura 5 – Micrografia eletrônica de transmissão da célula secretora da glândula mandibular de rainha virgem recém-emergida de *M. scutellaris*. A – Porção mediana da célula mostrando retículo endoplasmático liso (REL) e mitocôndrias (Mt). Barra: 1  $\mu$ m. B – Detalhe da célula secretora com o canal coletor (Ca). Barra: 1  $\mu$ m.

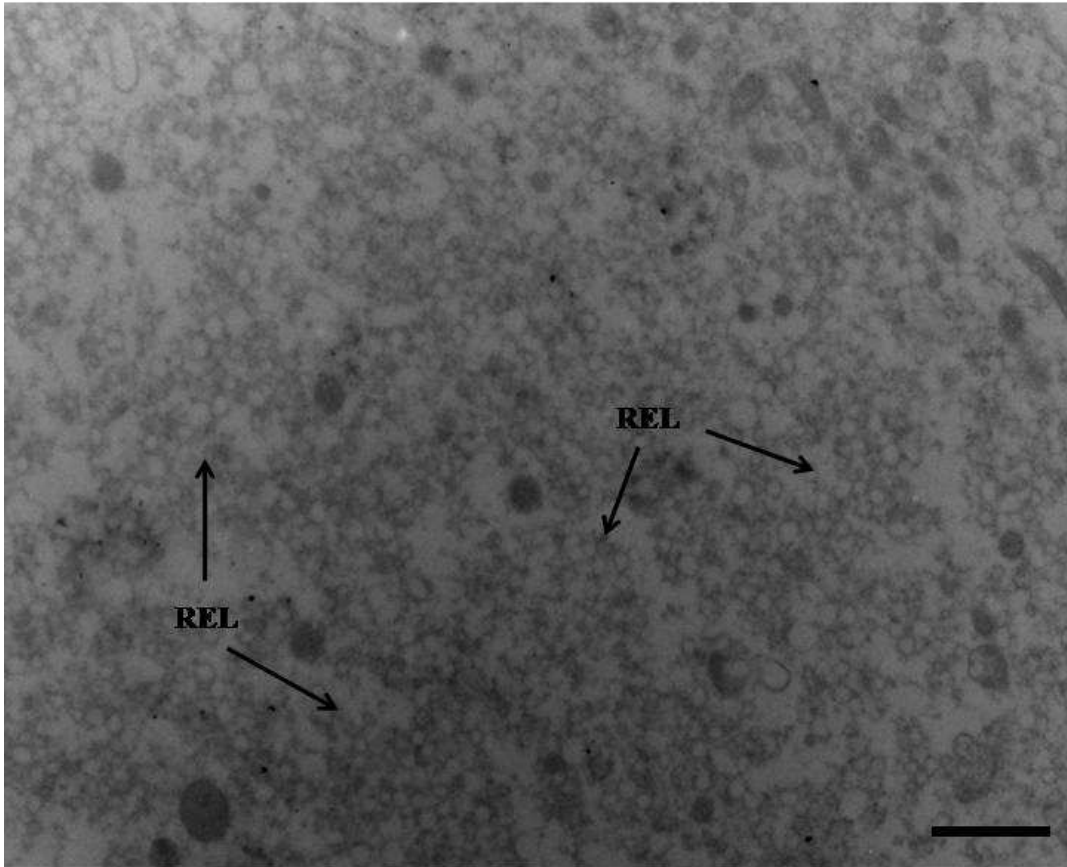


Figura 6 - Micrografia eletrônica de transmissão da célula secretora da glândula mandibular de rainha virgem recém-emergida de *M. scutellaris* mostrando riqueza de retículo endoplasmático liso (REL). Barra: 1 $\mu$ m.

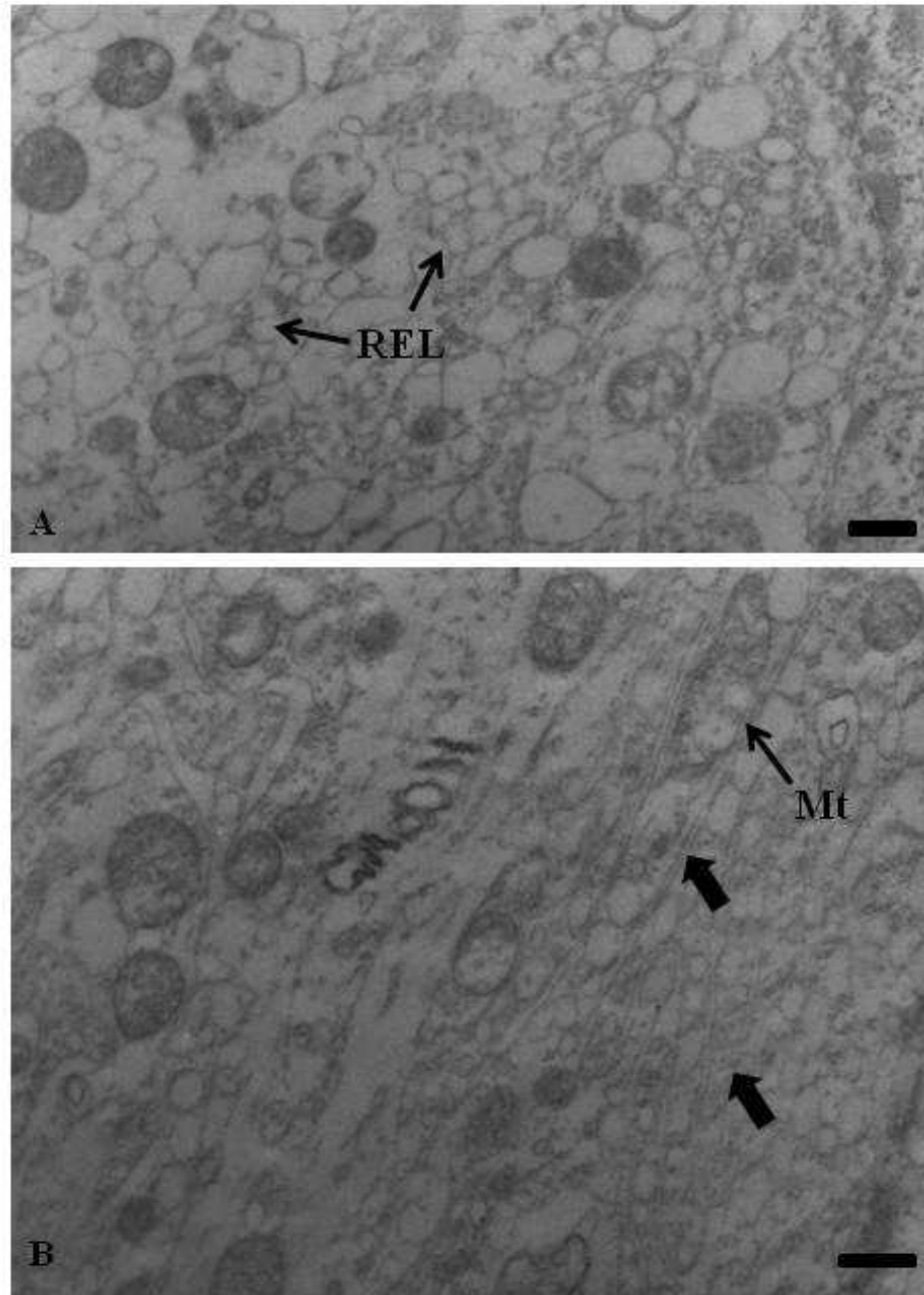


Figura 7 – Micrografia eletrônica de transmissão do epitélio secretor da mandíbula de rainha virgem com sete dias de idade de *M. scutellaris*. A – Porção mediana da célula com retículo endoplasmático liso (REL) e mitocôndrias (Mt). Barra: 1 µm. B – Porção basal da célula com invaginações da membrana plasmática (setas largas) associadas à mitocôndrias (Mt). Barra: 1 µm.

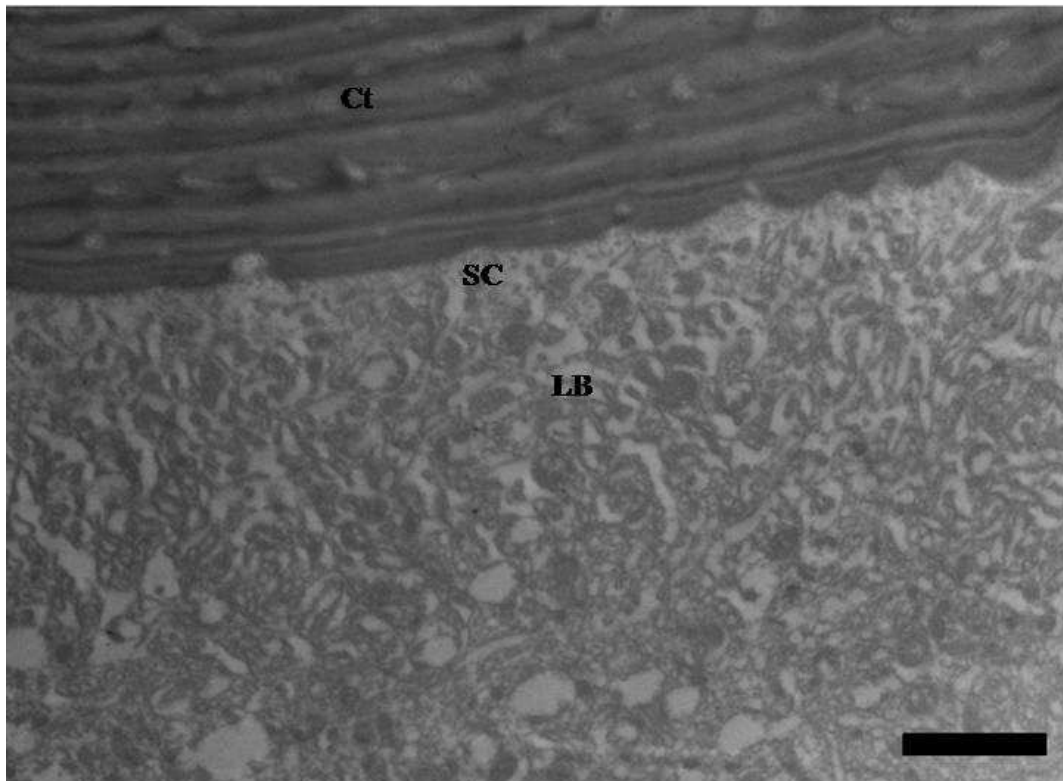


Figura 8 – Micrografia eletrônica de transmissão do epitélio secretor da mandíbula da rainha virgem recém-emergida de *M. scutellaris* mostrando a porção apical com projeções da membrana plasmática formando um labirinto (LB) no espaço subcuticular (SC). Ct: cutícula. Barra: 5  $\mu$ m.

## CONCLUSÃO GERAL

Em *M. scutellaris*, as rainhas virgens com até quatro dias de idade não são atacadas pelas operárias, enquanto rainhas a partir de cinco dias começam a ser agredidas e são mortas com tempo mediano de vida de setes dias de idade. O ataque das operárias foi precedido pelo contato de suas antenas na região do abdômen das rainhas virgens, sendo o ataque caracterizado pela decapitação das rainhas.

O perfil de hidrocarbonetos cuticulares de rainhas virgens de *M. scutellaris* difere com o avançar da idade e sofre influência da rainha fisogástrica. Além disso, o perfil de hidrocarbonetos cuticulares das rainhas virgens difere do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de rainhas fisogástricas.

As glândulas madibulares e intramandibulares apresentaram áreas celulares totais diferentes de acordo com a idade, mas não apresentaram diferenças para os testes histoquímicos e na sua ultra-estrutura. Estas glândulas apresentaram riqueza em retículo liso, característica que indica síntese de lipídios. O epitélio da mandíbula também apresentou características morfológicas semelhantes às das glândulas mandibulares e intramandibulares.

Como as rainhas virgens de *M. scutellaris* são mortas em média com sete dias de idade e que o perfil de hidrocarbonetos cuticulares dessas rainhas difere do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de rainhas recém-emergidas, acreditamos que exista um reconhecimento químico das rainhas virgens pelas operárias. Além disso, acreditamos que as glândulas mandibulares e intramandibulares podem contribuir com a síntese de feromônios que induz o reconhecimento das rainhas pelas operárias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla, F.C. & Cruz-Landim, C. 2002. **Glândulas Exócrinas das Abelhas**. Funpec-RP. 181p.

Abdalla, F.C.; Jones, G.R.; Morgan, E.D.; Cruz-Landim, C. 2003. Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. **Genet. Mol. Res.** 2: 191-199.

Abdalla, F.C.; Jones, G.R.; Morgan, E.D.; Cruz-Landim, C. 2004. Chemical composition of the Dufour gland secretion in queens of *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Meliponini). **J. Braz. Chem. Soc.** 15: 621-625.

Abdalla, F.C. & Cruz-Landim, C. 2005. Ocorrência, morfologia e ultra-estrutura da glândula de Dufour de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Neot. Entomol.** 34: 47-57.

Andersen, S.O. 1979. Biochemistry of insect cuticle. **Ann. Rev. Entomol.** 24: 29-61.

Ayasse, M.; Engels, W.; Lübke, G.; Taghizadeh, T.; Francke, W. 1999. Mating wpenditures reduced via female sex pheromone modulation in the primitively eusocial halictine bee, *Lasioglossum* (Evylaeus) *malachurum* (Hymenoptera: Halictidae). **Behav. Ecol. Sociobiol.** 45: 95-106.

Billen, J. & Morgan, E.D. 1998. **Pheromone communication in social insects-sources and secretions**. Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites (ed. by R.K. Vander Meer, M.D. Breed, M.L. Winston and K.E. Espelie), PP. 3-33. Westview Press, Boulder, Colorado.

Billen, J. & Espadaler, X. 2002. A novel epithelial intramandibular gland in the ant *Pyramica membranifera* (Hymenoptera: Formicidae). **Belg. J. Zool.** 132: 175-176.

Blomquist, G.J. & Bagnères, A. 2010. **Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, And Chemical Ecology**. Cambridge University Press. 492pp.

Blum, M.S. & Brand, J.M. 1972. Social insect pheromones: their chemistry and function. **Am. Zool.** 12: 553-576.

Bonavita-Cougourdan, A.; Clement, J.L.; Lange, C. 1987. Nestmate recognition: The role of cuticular hydrocarbons in the ant *Camponotus vagus*. **Scop. J. Entomol.** 22: 1-10.

Bonavita-Cougourdan, A.; Théraulaz, G.; Bagnères, A.G.; Roux, M.; Pratte, M.; Provos, E.; Clément, J. 1991. Cuticular hydrocarbons, social organization and ovarian development in a polistine wasp: *Polistes dominulus* Christ. **Comp. Biochem. Physiol.** 100: 667-680.

Breed, M.D. 1983. Nestmate recognition in honey bees. **Anim. Behav.** 31: 86-91.

Cahlíková, L.; Horvorka, O.; Ptáček, V.; Valterová, I. 2004. Exocrine glands secretions of virgin queens of Five bumblebee species (Hymenoptera: Apidae, Bombini). **Z. Naturforsch** 59: 582-589.

Caliman, M.J.F. 2008. Caracterização do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de operárias, rainhas virgens e rainhas fisogástricas de *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. 56p. **Dissertação de Mestrado.**

Caliman, M.J.F.; Nascimento, F.S.; Turatti, I.C.; Mateus, S.; Lopes, N.P.; Zucchi, R. 2010. The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. **J. Insect Physiol.** 56: 800-804.

Carlson, D.A.; Offor, I.I.; El Messoussi, S.; Matsuyama, K.; Mori, K.; Jallon, J.M. 1998. Sex pheromone of *Glossina tachinoides*: isolation, identification and synthesis. **J. Chem. Ecol.** 24: 1563-1574.

Carlson, D.A. Geden, C.J.; Bernier, U.R. 1999. Identification of pupal exuviae of *Nasonia vitripennis* and *Muscidifurax raptorellus* parasitoids using cuticular hydrocarbons. **Biol. Control** 15: 97-106.

Chapman, R.F. 1988. **The insect: Structure and Function.** American Elsevier. Publishing Company, New York. 770p.

- Costa, A.M.F. & Cruz-Landim, C. 1977. Estudo comparativo das glândulas do sistema salivar dos Apidae sociais (Hymenoptera). **Rev. Bras. Biol.** 37: 649-663.
- Costa-Leonardo, A.M. 1978. Glândulas intramandibulares em abelhas sociais. **Ciênc. Cult.** 30: 835-838.
- Cruz-Landim, C. 1967. Estudo comparativo de algumas glândulas das abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. **Arq. Zool.** 15: 177-290.
- Cruz-Landim, C. & Reginato, R.D. 2001. Exocrine glands of *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Braz. J. Biol.** 61: 497-505.
- Cruz-López, L.; Malo, E.D.; Rincon, M.; Guzmán, M.; Rojas, J.C. 2005. Mandibular gland secretion of *Melipona beecheii*: Chemistry and Behavior. **J. Chem. Ecol.** 31: 1621-1632.
- Cuvillier-Hot, V.; Cobb, M.; Malosse, C.; Peeters, C. 2001. Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. **J. Insect Physiol.** 47: 485-493.
- D'Ettoire, P.; Heinze, J.; Schulz, C.; Francke, W.; Ayasse, M. 2004. Does she smell like a queen? Chemoreception of a cuticular hydrocarbons signal in the ant *Pachycondyla inversa*. **J. Exp. Biol.** 207: 1085-1091.
- Ebbs, M.L. & Amrein, H. 2007. Taste and pheromone perception in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Pflugers Arch. - Euro. J. Physiol.** 454: 735-747.
- Engels, W. 1987. Pheromones and reproduction in Brazilian stingless bees. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 35-45.
- Engels, E.; Engels, W.; Lübke, G.; Schröder, W.; Francke, W. 1993. Age-related patterns of volatile cephalic constituents in queens of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona postica* Latr (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie** 24: 539-548.
- Engels, W.; Rosenkranz, P.; Adler, A.; Taghizadeh, T.; Lübke, G.; Francke, W. 1997. Mandibular gland volatiles and their ontogenetic patterns in queen honey bees, *Apis mellifera carnica*. **J. Insect Physiol.** 43: 307-313.”

- Everaerts, C.; Farine, J.; Cobb, M.; Ferveur, J. 2010. *Drosophila* cuticular hydrocarbons revisited: Mating status alters cuticular profiles. **PLoS One** 5: 1-12.
- Gibbs, A.G. 2002. Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. **J. Insect Physiol.** 48:391-400.
- Gracioli, L.F., Silva de Moraes, R.L.M.; Cruz-Landim, C. 2004. Ultrastructural aspects of the mandibular gland of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) in the castes. **Micron** 35: 331-336.
- Gracioli-Vitti, L.F.; Abdalla, F.C.; Silva de Moraes, R.L.M.; Jones, G.R. 2004. The chemical composition of mandibular gland secretion of *Melipona bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A comparative study among castes and sexes. **J. Braz. Chem. Soc.** 15: 777-781.
- Grasso, D.A.; Visicchio, R.; Castracani, C.; Mori, A.; Moli, F.L. 2003. The mandibular glands as a source of sexual pheromones in virgin queens of *Polyergus rufescens* (Hymenoptera, Formicidae). **Ital. J. Zool.** 70: 229-232.
- Guerino, A.C. & Cruz-Landim, C. 2003. Ocorrência e morfologia das glândulas tegumentares do abdome de algumas abelhas (Hymenoptera: Apidae): Um estudo comparado. **Neot. Entomol.** 32: 261-267.
- Haverty, M.I.; Page, M.; Nelson, L.J.; Blomquist, G.J. 1988. Cuticular hydrocarbons damp-wood termites, *Zootermopsis*: Intra- and intercolony variation and potential as taxonomic characters. **J. Chem. Ecol.** 14: 1035-1058.
- Hora, R.R.; Ionescu-Hirsh, A.; Simon, T.; Delabie, J.H.C.; Robert, J.; Fresneau, D.; Hefetz, A. 2008. Postmating changes in cuticular chemistry and visual appearance in *Ectatomma tuberculatum* queens (Formicidae: Ectatomminae). **Naturwissenschaften** 95: 55-60.
- Hora, R.R.; Delabie, J.H.C.; Santos, C.G.; Serrão, J.E. 2010. Glandular epithelium as a possible source of a fertility signal in *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae) queens. **PLoS** 5: 1-7.

Howard, R.W. 1993. **Cuticular hydrocarbons and chemical communication**. In D.W. Stanley-Samuelson and D.R. Nelson (eds.), *Insect lipids*: University of Nebraska Press, Lincoln, Nebraska.

Howard, R.W. & Blomquist, G.J. 2005. Ecological, behavioural, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. **Ann. Rev. Entomol.** 50: 371-393.

Imperatriz-Fonseca, V.L.; Zucchi, R. 1995. Virgin queens in stingless bee (Apidae, Meliponinae) colonies: a review. **Apidologie** 26: 231-244.

Izzo, A.; Wells, M.; Huang, Z.; Tibbetts, E. 2010. Cuticular hydrocarbons correlate with fertility, not dominance, in a paper wasp, *Polistes dominulus*. **Behav. Ecol. Sociobiol.** 64: 857-864.

Jarau, S.; Van Veen, J.; Aguilar, I.; Ayasse, M. 2009. Virgin queen execution in the stingless bee *Melipona beecheii*: The sign stimulus for worker attacks. **Apidologie** 40: 496-507

Jarau, S.; Van Veen, J.; Aguilar, I.; Ayasse, M. 2010. A scientific note on virgin queen acceptance in stingless bees: evidence for the importance of queen aggression. **Apidologie** 41: 38-39.

Kaatz, H.H.; Hildebrandt, H.; Engels, W. 1992. Primer effect of queen pheromone on juvenile hormone biosynthesis in adult worker honey bees. **J. Comp. Physiol.** 162: 588-592.

Katzav-Gozansky, T.; Soroker, F.I.; Francke, W.; Hefetz, A. 2001. Dufour's gland secretion of the queen honeybee (*Apis mellifera*): an egg discriminator pheromone or a queen signal? **Behav. Ecol. Sociobiol.** 51: 76-86.

Kerr, W.E.; Zucchi, R.; Nakadaira, J.T.; Butolo, J.E. 1962. Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae). **J. N. Y. Entomol. Soc.** 70: 267-276.

Kerr, W.E.; Carvalho, G.A.; Nascimento, V.A. 1996. *Abelha Uruçu*: Biologia, Manejo e Conservação. 1ed. Belo Horizonte: Editora Acangaú. 144pp.

- Kerr, W.E.; Nascimento, V.A.; Carvalho, G.A. 1999. Preservation of native Brazilian bees: A question of historical and ecological conscience. **Ciência e Cultura** **51**: 390–393.
- Kerr, W.E.; Jungnickel, H.; Morgan, E.D. 2004. Workers of the stingless bee *Melipona scutellaris* are more similar to males than to queens in their cuticular compounds. **Apidologie** **35**: 611-618.
- Kleinert, A.M.P.; & Imperatriz-Fonseca, V.L. 1994. Virgin queens refuges in colonies of *Melipona marginata* (Apidae, Meliponinae). **Rev. Bras. Biol.** **54**: 247-251.
- Kleinert, A.M.P. 2005. Colony strength and queen replacement in *Melipona marginata* (Apidae: Meliponini). **Rev. Bras. Biol.** **65**: 469:476.
- Koedam, D. 1999. Production of queens, workers and males in the stingless bee *Melipona favosa* (Apidae: Meliponinae): Pattern in time and space. **Neth. J. Zool.** **49**: 289-302.
- Lamartine, H. 1962. A area da abelha urucu do Nordeste. **Chácaras e Quintais** **106**: 801.
- Layton, J.M.; Camann, M.A.; Espelie, K.E. 1994. Cuticular lipid profiles of queens, workers, and males of social wasp *Polistes metricus* Say are colony-specific. **J. Chem. Ecol.** **20**: 2307-2321.
- Matiello, C.P.G. 2008. Estudo comparado das sensilas nas antenas de abelhas. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 50p. **Dissertação de Mestrado.**
- Michener, C.D. 1974. **The social behavior of the bees.** The Belkman Press of Harvard University Press. Cambridge Massachusetts. 404p.
- Miller, D.G. & Ratnieks, F.L.W. 2001. The timing of worker reproduction and breakdown of policing behaviour in queenless honey bee (*Apis mellifera*) societies. **Insect Soc.** **48**: 178-184.
- Monnin, T. 2006. Chemical recognition of reproductive status in social insects. **Ann. Zool. Fennici** **43**: 515-530.

- Moure, J.S. & Kerr, W.E. 1950. Sugestões para a modificação das sistemática do gênero *Melipona*. **Dusenía** 1: 105-129.
- Nedel, O.J. 1960. Morphologie und physiologie der mandibeldrüse einiger Bienen Arten (Apidae). **Z. Morph. Okel.** 49: 139-183.
- Nelson, D.R.; Dillwith, J.W.; Blomquist, G.J. 1981. Cuticular hydrocarbons of the house fly, *Musca domestica*. **Insect Biochem.** 11: 187-197.
- Noirot, C. & Quennedey, A. 1974. Fine structure of insect epidermal glands. **Ann. Rev. Entomol.** 19: 61-80.
- Noirot, C. & Quennedey, A. 1991. Glands, gland cell, glandular units: some comments on terminology and classification. **Ann. Soc. Ent. Fr.** 27: 123-128.
- Nunes, T.M.; Turatti, I.C.C.; Mateus, S.; Nascimento, F.S.; Lopes, N.P.; Zucchi, R. 2009. Cuticular hydrocarbon in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age. **Genet. Mol. Res.** 8: 589-595.
- Opelt, A. & Heinze, J. 2009. Mating is associated with immediate changes of the hydrocarbon profile of *Leptothorax gredleri* ant queens. **J. Insect Physiol.** 55: 624-628.
- Page, R.E.; Metcalf, R.A.; Erickson, E.H.J.; Lampman, R.L. 1991. Extractable hydrocarbons and kin recognition in honeybee (*Apis mellifera* L.) **J. Chem. Ecol.** 17: 745-756.
- Pankiw, T.; Winston, M.L.; Slessor, K.N. 1994. Variation in worker response to honey bee (*Apis mellifera*) queen mandibular pheromone (Hymenoptera: Apidae). **J. Insect Behav.** 7: 1-15.
- Pearse, A.G.E. 1985. **Histochemistry: Theoretical and Applied.** Churchill, London.
- Peters, L.; Shu-Salzman, K.; Pankiw, T. 2010. Effect of primer pheromones and pollen diet on the food producing glands of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **J. Insect Physiol.** 56: 132-137.

- Pianaro, A.; Flach, A.; Patricio, E.F.L.R.A.; Nogueira-Neto, P. Marsaioli, A.J. 2007. Chemical changes associated with the invasion of a *Melipona scutellaris* colony by *Melipona rufiventris* workers. **J. Chem. Ecol.** 33: 971-984.
- Polerstock, A.R.; Eigenbrode, S.D.; Klowden, M.J. 2002. Mating alters the cuticular hydrocarbons of female *Anopheles gambiae* sensu strict and *Aedes aegypti* (Diptera: Culidae). **J. Med. Entomol.** 39: 545-552.
- Pomonis, J.G. 1989. Cuticular hydrocarbons of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). Isolation, identification and quantification as a function of age, sex and irradiation. **J. Chem. Ecol.** 15: 2301-2317.
- Quénu, C. 1957. Sur les femelles d'été de *Halictus scabiosae* (Rossi). **Compt. Rend. Acad. Sci.** 244: 1073-1076.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.** 17: 208-212.
- Roig-Alsina, A. & Michener, C.D. 1993. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). **Univ. Kansas Sci. Bull.** 55: 123-162.
- Ruther, J.; Sieben, S.; Schrickler, B. 1998. Role of cuticular lipids in nestmate recognition of the European hornet *Vespa crabro* L. (Hymenoptera, Vespidae). **Insectes Soc.** 45: 169-179.
- Sakagami, S.F. & Fukushima, k. 1961. Female dimorphism in a social halictine bee, *Halictus* (Seladonia) *aerarius* (Smith). **Jap. J. Ecol.** 11: 118-124.
- Sakagami, S.F. & Oniki, Y. 1963. Behaviour studies of the stingless bees, with special reference to the oviposition process. I *Melipona compressipes manaosensis* Schwarz, **J. Fac. Hokkaido Univ. Ser. VI Zool.** 15: 300-318.
- Sakagami, S.F.; Montenegro, M.J.; Kerr, W.E. 1965. Behaviour studies of the stingless bees, with special reference to the oviposition process. V. *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier. **J. Fac. Hokkaido Univ. Ser. VI Zool.** 15-578-607.

Sakagami, S.F. & Hayashida, K. 1968. Bionomics and sociology of the summer matrifilial phase in the social halictine bee, *Lasioglossum duplex*. **J. Fac. Sci., Hokkaido Univ.** 16: 413-513.

Santos, C.G.; Megiolaro, F.L.; Serrão, J.E.; Blochtein, B. 2009. Morphology of the head salivary and intramandibular glands of the stingless bee *Plebeia emerina* (Hymenoptera: Meliponini) workers associated with propolis. **Ann. Entomol. Soc. Am.** 102: 137-143.

Santos, D.E.; Souza, E.A.; Serrão, J.E. 2010. Glândulas intramandibulares como uma possível fonte de sinal para a execução das rainhas de *Melipona scutellaris*. **In: Encontro sobre Abelhas.** Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Santos-Filho, P.S.; Alves, D.A.; Eterovic, A.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Kleinert, A.M.P. 2006. Numerical investment in sex and caste by stingless bees (Apidae: Meliponini): a comparative analysis. **Apidologie** 37: 207-221.

Schal, C.; Sevala, V.L.; Young, H.P.; Bachmann, J.A.S. 1998. Sites of synthesis and transport pathways of insect hydrocarbons: Cuticle and ovary as target tissues. **Amer. Zool.** 38: 382-393.

Silva, D.L.N.; Zucchi, R.; Kerr, W.E. 1972. Biological and behavioural aspects of the reproduction in some species of *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Anim. Behav.** 20: 123-132.

Simmons, L.W.; Alcock, J.; Reeder, A. 2003. The role of cuticular hydrocarbons in male attraction and repulsion by female Dawson's burrowing bee, *Amegilla dawsoni*. **Anim. Behav.** 66: 677-685.

Singer, T.L. 1998. Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. **Amer. Zool.** 38: 394-405.

Snodgrass, R.E. 1956. **Anatomy of the honey bee.** Constock Publishing Associate New York., 332p.

- Sommeijer, M.J.; De Bruijn, L.L.M.; Meeuwssen, F.J.A.J.; Martens, E.P. 2003. Natural patterns of caste and sex allocation in the stingless bees *Melipona favosa* and *M. trinitalis* related to worker behavior. **Insectes Soc.** 50: 38-44.
- Stefanini, M.; Demartino, C.; Zamboni, L. 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature** 216: 173-174.
- Strauss, K.; Scharpenberg, H.; Crewe, R.M.; Glahn, F.; Foth, H.; Moritz, R.F.A. 2006. The role of the queen mandibular gland pheromone in honeybees (*Apis mellifera*): honest signal or suppressive agent? **Behav. Ecol. Sociobiol.** 62: 1523-1531.
- Topoff, H. & Greenberg, L. 1988. Mating behavior of the socially-parasitic ant *Polyergus breviceps*: the role of the mandibular glands. **Psyche** 95: 81-87.
- Van Veen, J.W.; Sommeijer, M.J.; Aguilar, M.I. 1999. Behavioural development and abdomen inflation of gynes and newly mated queens of *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponinae). **Insectes Soc.** 46: 361-365.
- Velthuis, H.H.W. 1997. Biologia das abelhas sem ferrão. São Paulo: Edusp.
- Wagner, D.; Tissot, M.; Gordon, D. 2001. Task-related environment alters the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants. **J. Chem. Ecol.** 27: 1805-1819.
- Wenseleers, T.; Hart, A.G.; Ratnieks, F.L.W.; Quezada-Euàn, J.J.G. 2004. Queen execution and caste conflict in the stingless bee *Melipona beecheii*. **Ethology** 110: 725-736.
- Wigglesworth, V.B. 1957. The physiology of insect cuticle. **Ann. Rev. Entomol.** 2: 37-54.
- Wilson, E.O. 1963. Pheromones. **Sci. Amer.** 208: 100-114.
- Wilson, E.O. 1971. **The insect societies.** The Belknap Press of Harvard University Press Cambridge, London. 548pp.

Wossler, T.C.; Jones, G.E.; Allsopp, M.H.; Hepburn, R. 2006. Virgin queen mandibular gland signals of *Apis mellifera capensis* change with age and affect honeybee worker responses. **J. Chem. Ecol.** 32: 1043-1056.