

**MARCONDES ANDRADE DIAS**

**COMPOSIÇÃO DOS PERFIS DE HIDROCARBONETOS CUTICULARES NO  
SISTEMA TRITRÓFICO *Azteca-Cecropia-Chaetothyriales***

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

Orientador: Eraldo Rodrigues Lima

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2019**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

D541c  
2019  
Dias, Marcondes Andrade, 1992-  
Composição dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares no sistema tritrófico *Azteca-Cecropia-Chaetothyriales* / Marcondes Andrade Dias. – Viçosa, MG, 2019.  
27f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.25-27.

1. Ecologia química. 2. Semioquímicos. 3. Siombiose.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Mestrado em Entomologia. II. Título.

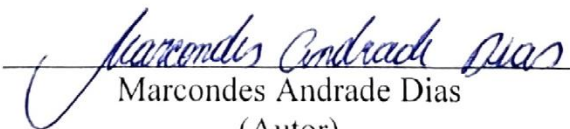
CDD 22 ed. 577.14

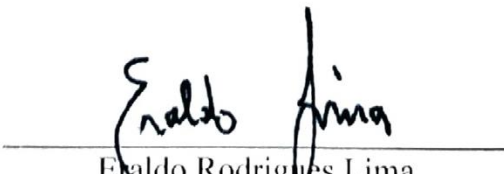
**MARCONDES ANDRADE DIAS**

**COMPOSIÇÃO DOS PERFIS DE HIDROCARBONETOS CUTICULARES NO  
SISTEMA TRITRÓFICO *Azteca-Cecropia-Chaetothyriales***

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

APROVADA: 31 de julho de 2019

  
Marcondes Andrade Dias  
(Autor)

  
Eraldo Rodrigues Lima  
(Orientador)

*"Stop giving power to people who don't believe in  
science."*

**(Harrison Ford)**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, em especial à minha avó e minha mãe que sempre foi figura basilar durante todo o meu processo educacional enquanto pessoa e profissional.

Agradeço ao meu marido que esteve comigo durante todo o processo de desenvolvimento deste manuscrito.

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Semioquímicos e comportamento de insetos pelo apoio e colaboração durante coleta.

Agradeço à Gabi que se mostrou uma parceria formidável durante meu mestrado, meu muito obrigado.

Agradeço à minha comissão de orientação Eraldo, Ricardo Campos e Diogo pelo direcionamento durante esse trajeto.

Agradeço à todos os demais colegas e amigos que estiveram presentes na minha vida durante esses dois anos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

**Muito obrigado!**

## RESUMO

DIAS, Marcondes Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Composição dos perfis químicos de hidrocarbonetos cuticulares no sistema tritrófico *Azteca-cecropia*-Chaetothyriales.** Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima.

A comunicação química é crucial para a organização em insetos sociais. Apesar disso, o processo de transmissão e codificação desses compostos químicos tem-se revelado um grande desafio para ecólogos. Neste trabalho tivemos como objetivo investigar a similaridade dos compostos químicos de cutícula da formiga *Azteca muelleri* com seu fungo simbiote (Chaetothyriales) e sua planta mirmecófito hospedeira (*Cecropia glaziovii*) no intuito de entender se as duas principais fontes de alimento da formiga poderiam influenciar em sua composição cuticular. Além disso, ao compararmos o perfil cuticular de *A. muelleri* com sua parente próxima não simbiote de *Cecropia* (*Azteca chartifex*), testamos a importância da filogenia sobre a determinação desse perfil químico. Coletamos um total de 34 plantas com colônias de *Azteca muelleri*, 33 com corpúsculos mullerianos, 22 com fungo e 5 colônias de *A. chartifex* em três fragmentos de Mata Atlântica no município de Viçosa – Minas Gerais, Brasil. Para analisar os compostos de cutícula realizamos extrações com hexano através do método de padronização interna (*trans,trans*-farnesol (C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O) eliminando picos que estivessem presentes em menos de 50% das amostras. Nossos resultados demonstraram uma similaridade relativamente alta entre o fungo Chaetothyriales e operárias de *A. muelleri*, bem como uma relação positiva de três alcenos presentes no fungo sobre os mesmos presentes nas formigas. Ao contrário, existe uma baixíssima similaridade química entre *A. muelleri*, *A. chartifex*, *C. glaziovii*. Esses resultados demonstram que o fungo Chaetothyriales, principalmente por via trófica, parece ter influência crucial na formação dos compostos cuticulares de *A. muelleri*. Dessa forma, nossos resultados parecem indicar que os hidrocarbonetos de cutícula em formigas são mais relacionados com o alimento ingerido do que outros aspectos ambientais ou filogenéticos. No entanto, são necessários mais estudos para melhor compreender a influência dos fatores ambientais em detrimento da filogenia para a formação dos hidrocarbonetos cuticulares em insetos.

Palavras-chave: Ecologia química. Semioquímicos. Simbiose.

## ABSTRACT

DIAS, Marcondes Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Composition of cutaneous hydrocarbon chemical stocks in the tritrophic system *Azteca-cecropia*-*Chaetothyriales***. Advisor: Eraldo Rodrigues de Lima.

Communication is important for the organization in social insects. Nevertheless, the process of transmission and codification of these chemical compounds has been a major challenge for ecologists. In this work we aimed to investigate the similarity of ant cuticle chemical compounds with its symbiotic fungus (*Chaetothyriales*) and host plant (*Cecropia glaziovii*), in order to understand if its two main food sources could influence its cuticular composition. Furthermore, when comparing *A. muelleri* cuticular profile with his non-symbiont close relative of *Cecropia* (*Azteca chartifex*), we tested the importance of phylogeny in determining this chemical profile. We collected a total of 34 plants with *Azteca muelleri* colonies, 33 with mullerian bodies and 22 with fungus and 5 colonies of *A. chartifex* in three Atlantic Forest fragments in Viçosa - Minas Gerais, Brazil. To analyze the cuticle compounds we performed hexane extractions using the internal standardization method (*trans,trans*-farnesol ( $C_{15}H_{26}O$ )) eliminating peaks that were present in less than 50% of samples. Our results demonstrated a relatively high similarity between the fungus *Chaetothyriales* and workers of *A. muelleri*, as well as a positive relationship of three alkenes present in the fungus on the same ones present in the ants. In contrast, there is very little chemical similarity between *A. muelleri*, *A. chartifex*, *C. glaziovii*. These results show that the fungus *Chaetothyriales*, mainly via the trophic pathway, seems to have a crucial influence on the formation of *A. muelleri* cuticular compounds. Thus, our results seem to indicate that ant cuticle hydrocarbons are probably more related to the food ingested than other environmental or phylogenetic aspects. However, further studies are needed to better understand the influence of environmental factors over phylogeny on the formation of cuticular hydrocarbons in insects.

Keywords: Chemical ecology. Semiochemicals. Symbiosis.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	8
2. Material e métodos.....	10
2.1. Área de estudo.....	10
2.2. Espécies estudadas .....	11
2.3. Coleta .....	12
2.4 Análise de compostos cuticulares .....	12
2.4.1 Extração (protocolo).....	12
2.4.2 Quantificação .....	13
2.4.3 Qualificação .....	13
2.5 Análise estatística .....	13
3. Resultados .....	14
3.1. Análise qualitativa da similaridade química .....	14
3.2. Análise quantitativa da similaridade química .....	15
3.2.1 Similaridade química entre sítios de coleta (operárias, fungo e corpúsculos).....	15
3.2.2 Similaridade química entre operárias, fungo e corpúsculos.....	18
4. Discussão .....	22
5. Conclusão.....	23
Referências.....	25

## 1. Introdução

A comunicação é fundamental para a organização dos organismos. Em insetos, a principal forma de comunicação é a química e compreender como a transmissão da informação é codificada é um dos maiores desafios da atualidade para os ecólogos químicos (MARTIN; DRIJFHOUT, 2009). O reconhecimento é principalmente importante em insetos sociais pois envolve reconhecimento de indivíduos da mesma colônia, sendo ele em grande parte realizado pelos compostos de cutícula (FRIZZI et al., 2015; GUILLEM, DRIJFHOUT, and MARTIN, 2016; FOURNIER et al., 2016).

Entre os compostos químicos de cutícula estão as ceras, álcoois, ácidos graxos, glicerídeos, esteróis, cetonas, aldeídos, ésteres, e hidrocarbonetos, sendo os últimos a maioria na cutícula e desenvolvem particular relevância no papel de reconhecimento de coespecíficos (LOCKEY, 1988). Até o ano de 2007 cerca de 1000 hidrocarbonetos cuticulares haviam sido descritos, entre eles os *n*-alcanos, monometil-alcanos, dimetil-alcanos, alcenos, dienos, trimetil-alcanos, metil-alcanos, metil-alcadienos, trienos e tetrametil-alcanos, sendo a maioria das cadeias carbônicas compreendidas entre C<sub>19</sub> e C<sub>33</sub> (MARTIN; DRIJFHOUT, 2009).

Os hidrocarbonetos de cutícula não são definidos de forma permanente, são hora desgastados, hora repostos, podendo ser afetados ainda pelo sexo, sazonalidade, estágio de desenvolvimento e variações na dieta (ESPELIE; CHAPMAN; SWORD, 1994; NATION, 2008). No entanto, parece não haver concordância na literatura sobre qual dos fatores, genéticos ou ambientais, exercem maior papel na determinação do perfil de hidrocarbonetos ou se são de fato contexto-dependente (SILVERMAN; LIANG, 2000; BUCZKOWSKI et al., 2005; KATHER; MARTIN, 2012).

No intuito de entender como o perfil de hidrocarbonetos variam ambientalmente Silverman & Liang (2000) estudaram como a formiga *Linepithema humile* captura os hidrocarbonetos cuticulares. Encontraram que podem ser transferidos por via trófica de uma espécie a outra, alterando completamente o perfil da espécie predadora. Mais especificamente, foi verificado que após 56 dias se alimentando apenas de um tipo de presa *L. humile* se tornou quimicamente similar às mesmas, sendo elas alternadamente as baratas *Blattella germanica* e *Supella longipalpa*.

A notável interação entre plantas mirmecófitas e formigas pode ser uma alternativa interessante de estudo. Nesses sistemas as plantas costumam ser beneficiadas pela proteção contra herbívoros, enquanto as colônias obtêm recurso como alimento e abrigo (JANZEN, 1966; DEL-CLARO et al., 1996). No sistema *Azteca-Cecropia* as

plantas liberam um composto rico em carboidratos na forma de glicogênio que servem de alimento para as formigas (RICKSON, 1971, 1976a, b).

Os corpúsculos, no entanto, não são a única fonte de alimento da colônia. Durante a colonização a rainha carrega consigo uma cepa de fungo da ordem Chaetothyriales (Ascomycota), um grupo de leveduras pretas caracterizadas por crescimento lento e hifas melanizadas, que podem estar relacionadas com a alimentação da rainha, bem como das primeiras operárias, uma vez que a coleta de corpúsculos ainda não tenha iniciado. Mais ainda, a oviposição é posterior ao estabelecimento do inóculo do fungo, demonstrando seu papel do fungo para o sucesso da colonização (MAYER et al., 2018).

Não obstante, mesmo que o sistema *Azteca-Cecropia* seja amplamente estudado em termos de sua ecologia (BERG; ROSSELLI, 2005), não há trabalhos que foquem na sua ecologia química entre a planta hospedeira (*Cecropia*) e seus simbioses (*Azteca* e Chaetothyriales). Apesar disso, pela natureza tri-trófica do sistema *Cecropia-Azteca-Chaetothyriales* o mesmo se torna um excelente modelo para estudo da origem de variação do perfil dos hidrocarbonetos. Isso ocorre, pois o mesmo permite testar se a natureza dos compostos químicos cuticulares de uma espécie de *Azteca* simbiote de *Cecropia* é mais similar às suas fontes de alimento (corpúsculo e fungo) ou à sua parente próxima (eg. uma outra espécie de *Azteca* não simbiote de *Cecropia*).

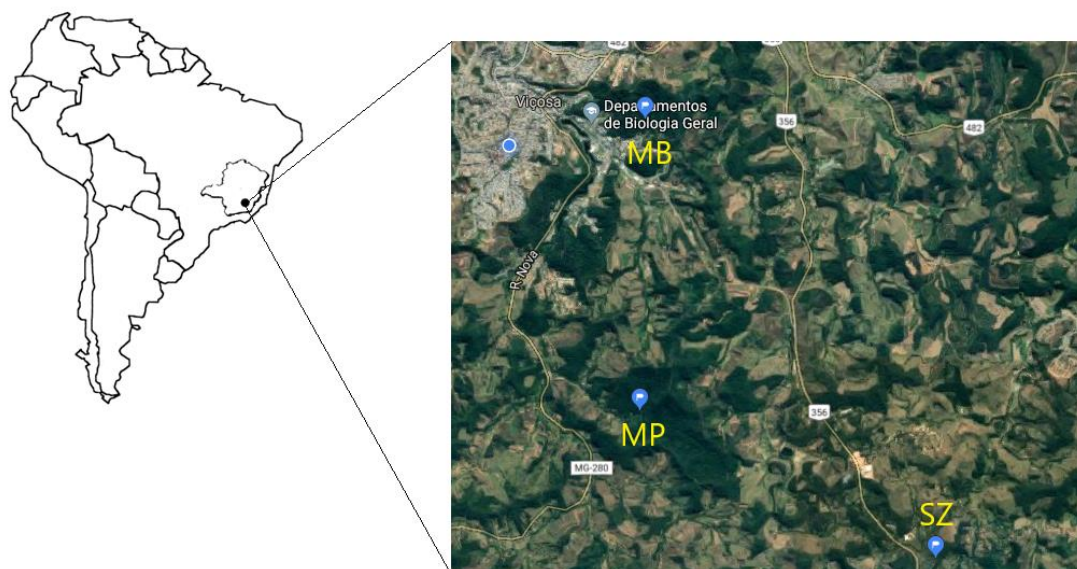
É nesta lacuna que esta dissertação pretende se inserir, dando margem ao entendimento do quão profunda essa interação inseto-planta-fungo pode estar estabelecida e qual o papel da planta e do fungo, enquanto fatores ambientais, na determinação do perfil químico de compostos cuticulares da formiga, em especial os hidrocarbonetos.

Dessa forma, nosso objetivo geral foi realizar uma análise química do perfil de compostos químicos superficiais no sistema *Azteca-Cecropia-Chaetothyriales*. Como objetivos específicos responderemos as seguintes perguntas: i) Qual a similaridade química dos compostos químicos superficiais de *Azteca muelleri*, sua planta hospedeira (*Cecropia glaziovii*) suas duas fontes principais de alimento, o fungo Chaetothyriales e os corpúsculos mullerianos e finalmente sua parente próxima não simbiote de *Cecropia* (*Azteca chartifex*)? ii) A partir dos compostos similares entre *A. muelleri* e suas duas fontes de alimento, existe um efeito das concentrações dos compostos do fungo e corpúsculos sobre os compostos das formigas?

## 2. Material e métodos

### 2.1. Área de estudo

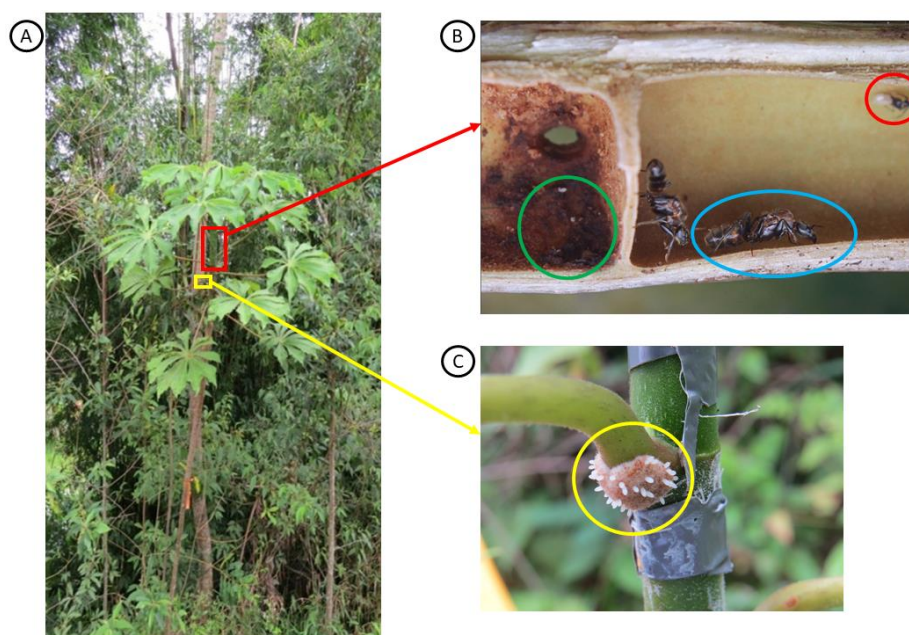
Coletamos em três fragmentos de Mata Atlântica localizados na cidade de Viçosa, Minas Gerais, sendo eles: Mata do Paraíso, Mata da Biologia e um fragmento florestal particular localizado às margens da BR-120/356 (Mata do Seu Zé) (Figura 1). A Estação de pesquisa Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso ( $20^{\circ} 38' 07''$  S,  $42^{\circ} 51' 31''$  W) é uma reserva que possui aproximadamente 195 ha e pertence à Universidade Federal de Viçosa (UFV), sendo administrada pelo Departamento de Engenharia Florestal da universidade. A Mata da Biologia ( $20^{\circ} 45' 29.8''$  S  $42^{\circ} 51' 43.1''$  W) está localizada no campus da Universidade Federal de Viçosa e possui área de aproximadamente 75 ha de mata sob proteção permanente e em processo de regeneração natural. Por fim, o Fragmento de mata às margens da BR-120/356, localizado entre Viçosa-MG e Coimbra-MG ( $20^{\circ} 49' 21.2''$  S  $42^{\circ} 48' 59.6''$  W), é uma mata em regeneração de propriedade privada. Os três locais têm como vegetação predominante a Floresta Atlântica Estacional Semidecidual Montana (VELOSO, 1991), onde há ocorrência de espécies de *Cecropia* associadas a formigas de *Azteca*.



**Figura 1.** Localização geográfica dos pontos de coleta. MP – Mata do Paraíso, MB – Mata da Biologia, SZ – Mata do Seu Zé.

## 2.2. Espécies estudadas

Nós utilizamos a planta mirmecófita *Cecropia glaziovii*, que na Floresta Estacional Semidecidual se encontra em locais úmidos e mais protegidos (BERG; ROSSELLI, 2005), possuindo distribuição principalmente em regiões de altitude entre 600-1.500 metros (BERG; ROSSELLI, 2005). As plantas de *C. glaziovii* geralmente associam-se a formigas da espécie *Azteca muelleri*, o que é explicado pela correlação com o hábitat em que vivem (DAVIDSON, 1991), o que inclui o fungo da ordem Chaetothyriales que é transportado pela rainha no momento da fundação da colônia (MAYER et al., 2018). Para fins de comparação de similaridade com outra espécie do mesmo gênero, utilizamos operárias de *Azteca chartifex*, que possuem hábitos contrastantes aos de *A. muelleri* como utilização de outra planta como hospedeira e formação de ninho cartão em forma de estalactite (DEJEAN et al., 2008). Identificamos as plantas com base na característica das folhas (BERG; ROSSELLI, 2005). Já as formigas de *A. muelleri* foram identificadas morfologicamente pelo taxonomista Júlio Chaul. (Figura 2).



**Figura 2.** A – Planta de *C. glaziovii*. B – Corte longitudinal da região apical do caule. C – Região axilar do pecíolo da folha representando as triquílias com formação de corpúsculos mullerianos. Círculo verde: fungo Chaetothyriales. Círculo amarelo: triquília e corpúsculo. Círculo vermelho: operária. Elipse azul: rainha.

## Coleta

Para a coleta plantas de *C. glaziovii* foi realizado corte do caule a aproximadamente 10cm do solo. Fragmentos da porção apical da planta foram levados a laboratório onde mantivemos a temperatura a  $-6^{\circ}\text{C}$  em *freezer* para posterior triagem dos fungos e operárias. Removemos as folhas em número de três, observando o melhor estado (herbivoria), seguido pela coleta de triquílias onde estão alojados os corpúsculos.

As colônias de *Azteca chartifex* estão localizadas em frente ao PVA (Pavilhão A) no Campus da Universidade Federal de Viçosa-MG ( $20^{\circ} 45' 38.2' \text{ S } 42^{\circ} 52' 3.61'' \text{ W}$ ).

Coletamos um total de 34 plantas com colônias de *A. muelleri* (10 em MB, 9 em MP e 15 em MZ), 33 com corpúsculo (13 em MB, 5 em MP e 15 em MZ) e 22 com fungo (6 em MP, 3 em MP e 13 em MZ) e 5 colônias de *Azteca chartifex*.

## 2.4 Análise de compostos cuticulares

### 2.4.1 Extração (protocolo)

Com exceção das folhas, todo o material foi mantido sob refrigeração de  $-6^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração. Enquanto o fungo foi submetido à secagem por meio de agente dessecante (sulfato de magnésio) por 24 horas antes da extração. O protocolo de extração segue abaixo:

- Operárias de *A. muelleri* – imergimos 5 operárias em  $50\mu\text{l}$  de hexano com padrão interno (*trans,trans*-farnesol a  $50\text{ng}/\mu\text{l}$ ) por 2 minutos.
- Operárias de *A. chartifex* – imergimos 10 operárias em  $50\mu\text{l}$  de hexano por 2 minutos.
- Corpúsculos – imergimos 5 corpúsculos  $5\mu\text{l}$  de hexano com padrão interno (*trans,trans*-farnesol a  $50\text{ng}/\mu\text{l}$ ) por 60 minutos.
- Folhas - um fragmento da folha foi parcialmente mergulhado em  $50\mu\text{l}$  de hexano por 30 minutos.
- Fungo - imergimos 0,010g de fungo (peso seco) em  $50\mu\text{l}$  de hexano com padrão interno (*trans,trans*-farnesol a  $50\text{ng}/\mu\text{l}$ ) por 20 minutos.

Injetamos os extratos de fungos, operárias de *A. muelleri* e corpúsculo em triplicata para fins de obtenção das médias de concentração (em nanogramas - *ng*) para os picos de interesse

## 2.4.2 Quantificação

Injetamos os extratos resultantes (1 µl) em equipamento de cromatografia gasosa, GC 17<sup>a</sup> (SHIMADZU) com coluna DB5 (RESTEK) de 30 metros e 0.25mm. Método de injeção: temperatura inicial de 100°C, rampa de aquecimento 10°C por minuto, temperatura final de 280°C (mantido por 10 minutos), temperatura do injetor de 250°C. Para quantificar a concentração dos perfis de compostos cuticulares de operárias de *A. muelleri*, corpúsculo e fungo utilizamos o método de padronização interna (*trans,trans*-farnesol (C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O)) (FISCHER, 2006).

## 2.4.3 Qualificação

Reutilizamos os extratos de fungos, operárias (de *A. muelleri* e *A. chartifex*), folhas e corpúsculos utilizados para a quantificação seguindo o mesmo método de injeção, em aparelho de cromatografia acoplado a espectrometria de massas (GCMS SHIMADZU QP2010 ULTRA/SE, coluna DB5 (RESTEK) de 30 metros e 0.25mm). Para a identificação, contamos com o auxílio do professor Diogo Montes Vidal, do Grupo de Ecologia Química do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas (UFMG), que realizou o estudo dos componentes com base no Índice de Kovats, derivatizações e base de dados.

## 2.5 Análise estatística

Para comparar a similaridade química de *A. muelleri* e de Chaetothyriales para os três locais realizamos análise NMDS (*Non-metric Multidimensional Scaling*). A ordenação NMDS foi baseada no índice de dissimilaridade de Bray-Curtis entre os locais. Para comparar a similaridade dos corpúsculos foi realizada ANOVA, sendo local variável explicativa (X) e os picos a variável resposta (Y). Para avaliar a diferença entre as médias fizemos teste de Tukey. Utilizamos um Modelo Gaussiano para análise de resíduos e distribuição dos erros. Todas as análises foram realizadas no R (TEAM, 2013).

Para investigar o efeito do ambiente (corpúsculo e fungo) na determinação do perfil químico de *A. muelleri* utilizamos modelos de regressão linear entre a concentração de cada pico similar entre o par interativo formiga-fungo e formiga-corpúsculo. Dado a natureza dos dados utilizamos modelos Gaussianos para análise de resíduos e distribuição

dos erros. As concentrações dos picos foram transformadas em log para obter a normalidade e homocedasticidade dos resíduos.

### 3. Resultados

#### 3.1. Análise qualitativa da similaridade química

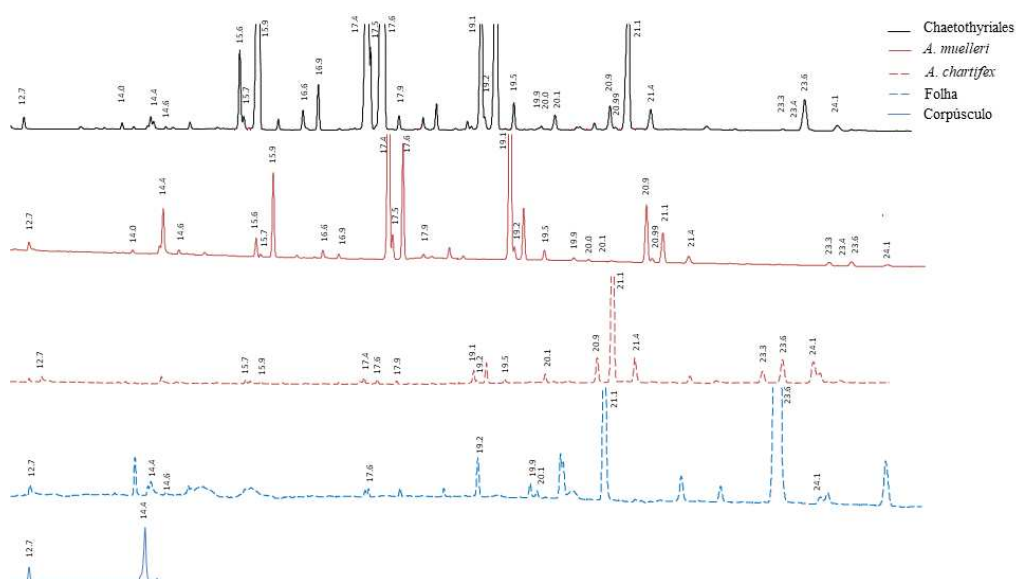
Utilizamos como método de corte os picos que compreendiam compostos de cutícula estando em pelo menos 50% das amostras injetadas.

As injeções em aparelhos de cromatografia (GC e GCMS) dos extratos de hexano para o corpo das operárias de *A. muelleri* resultaram em um total de 27 picos de compostos cuticulares, que foram selecionados quando apareciam em pelo menos 50% das amostras. Desses compostos 24 são hidrocarbonetos (8 alcanos lineares, 12 alcenos lineares e 4 metil-alcanos) e três não identificados. (Tabela 1).

As injeções de extratos dos fungos Chaetothyriales em peso seco perfizeram 37 picos. Destes, 27 são os mesmos encontrados nas operárias de *A. muelleri*. Ou seja, todos os picos de compostos cuticulares de formiga estão também nos fungos.

As análises de cromatografia de corpúsculos mullerianos revelaram a presença de apenas dois picos, sendo ambos também componentes do perfil químico das operárias de *A. muelleri* e dos fungos, por conseguinte (Figura 3).

As análises dos cromatogramas de operárias de *Azteca chartifex* resultaram em 16 picos que também são encontrados em *A. muelleri*. Um número menor do que os fungos possuem.



**Figura 3.** Cromatograma de uma das amostras para fungo Chaetothyriales (27 picos similares), operárias de *A. muelleri* (27 picos), operárias de *A. Chartifex* (16 picos similares), folhas de *C. glaziovii* (10 picos similares) e corpúsculos mullerianos (2 picos similares). Eixo Y = intensidade do sinal em Volts, eixo X = tempo em minutos (Tempo de Retenção - RT).

**Tabela 1.** Relação dos picos de compostos cuticulares de *Azteca muelleri*. CÓD. = número do pico. RT = tempo de retenção, KI = índice de Kovats. \* indica ausência de informação (localização da ramificação ou dupla ligação)

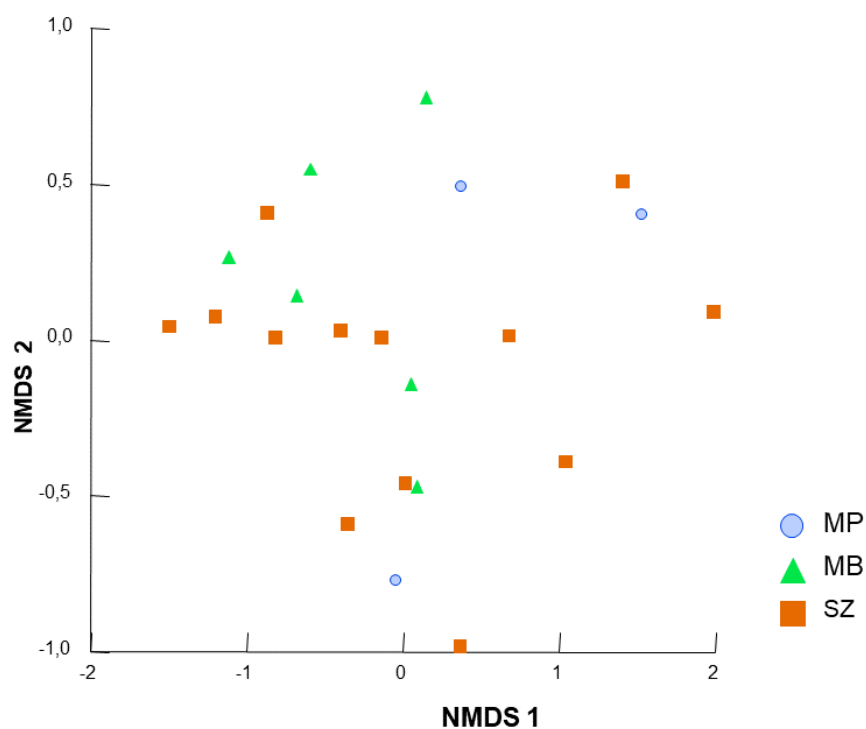
Cód.	RT	KI	Cadeia carbônica	GRUPO
1	12,7	1962	NI	NI
2	14	2092	C <sub>21</sub>	Alcano linear
3	14,4	2134	NI	NI
4	14,6	2155	NI	NI
5	15,6	2263	C <sub>23</sub> -Z9	Alceno linear
6	15,7	2274	C <sub>23</sub> -E9	Alceno linear
7	15,9	2296	C <sub>23</sub>	Alcano linear
8	16,6	2376	C <sub>24</sub> -Z*	Alceno linear
9	16,9	2411	C <sub>24</sub>	Alcano linear
10	17,4	2470	C <sub>25</sub> -Z9	Alceno linear
11	17,5	2482	C <sub>25</sub> -E9	Alceno linear
12	17,6	2494	C <sub>25</sub>	Alcano linear
13	17,9	2531	(*Me)-C <sub>25</sub>	Metil-alcano
14	19,1	2681	C <sub>27</sub> -Z9	Alceno linear
15	19,2	2693	C <sub>27</sub>	Alcano linear
16	19,5	2728	(*Me)-C <sub>27</sub>	Metil-Alcano
17	19,9	2775	C <sub>28</sub> -Z9	Alceno linear
18	20	2786	C <sub>28</sub> -E9	Alceno linear
19	20,1	2798	C <sub>28</sub>	Alcano linear
20	20,9	2879	C <sub>29</sub> -Z9	Alceno linear
21	20,99	2888	C <sub>29</sub> -E9	Alceno linear
22	21,1	2900	C <sub>29</sub>	Alcano linear
23	21,4	2926	(*Me)-C <sub>29</sub>	Metil alcano
24	23,3	3078	C <sub>31</sub> -D9*	Alceno linear
25	23,4	3085	C <sub>31</sub> -D9*	Alceno linear
26	23,6	3100	C <sub>31</sub>	Alcano linear
27	24,1	3130	(*Me)-C <sub>31</sub>	Metil-alcano

### 3.2. Análise quantitativa da similaridade química

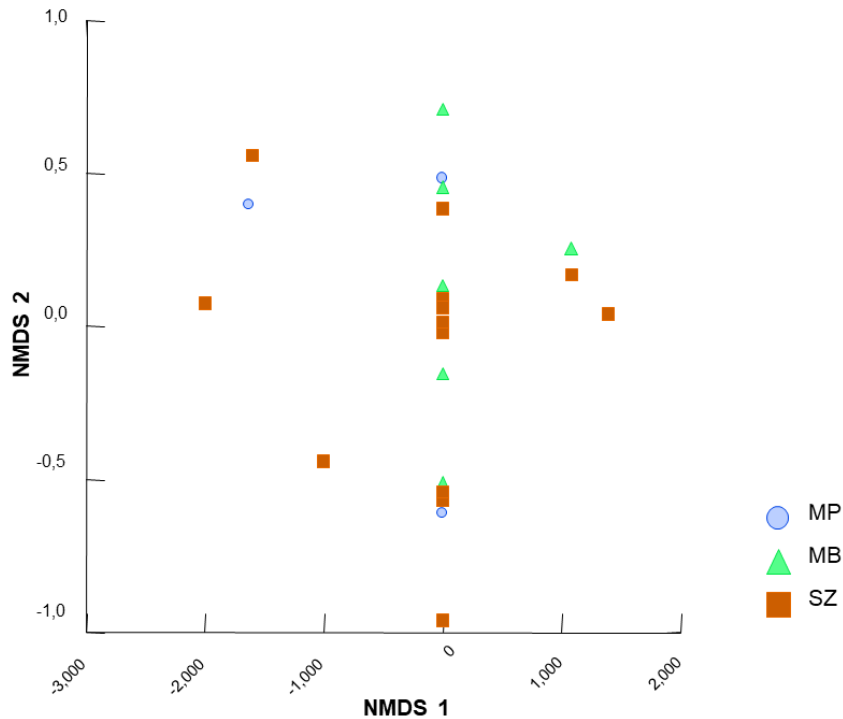
#### 3.2.1 Similaridade química entre sítios de coleta (operárias, fungo e corpúsculos)

Uma ordenação de similaridade química baseada nos 27 picos de operárias de *A. muelleri* demonstrou que não existe uma clara separação entre o perfil químico das operárias de formigas entre os três locais analisados (Figura 4). O mesmo resultado foi encontrado quando comparada a similaridade química dos 27 picos dos fungos entre os

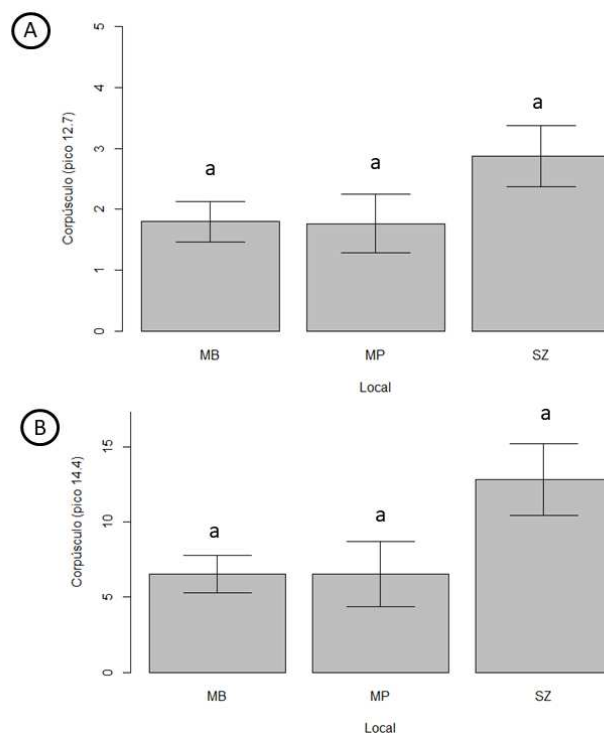
mesmos três locais (Figura 5). Da mesma forma, os picos 12,7 (Figura 6 (A),  $F_{2,30}=1.1239$ ;  $p=0.33$ ) e 14,4 (Figura 6 (B),  $F_{2,30}=1.9368$ ;  $p=0.16$ ) dos corpúsculos mullerianos também não demonstraram diferença entre suas médias de concentração para as três diferentes localidades (Figura 6 A e B).



**Figura 4.** Resultado entre perfil químico dos hidrocarbonetos de operárias de *A. muelleri* quanto aos três diferentes locais MP (Mata do Paraíso), MB (Mata da Biologia), SZ (Mata do Seu Zé) para os 27 picos (Tabela 1).  $N = 22$ . A ordenação por NMDS não demonstrou separação entre os locais. ( $Strees=0.101$ )



**Figura 5.** Resultado entre perfil químico de fungos Chaetothyriales quanto aos três diferentes locais MP (Mata do Paraíso), MB (Mata da Biologia), SZ (Mata do Seu Zé) para os 27 picos (Tabela 1). N = 22. A ordenação por NMDS não demonstrou separação entre os locais. (*Stress*=0.093)



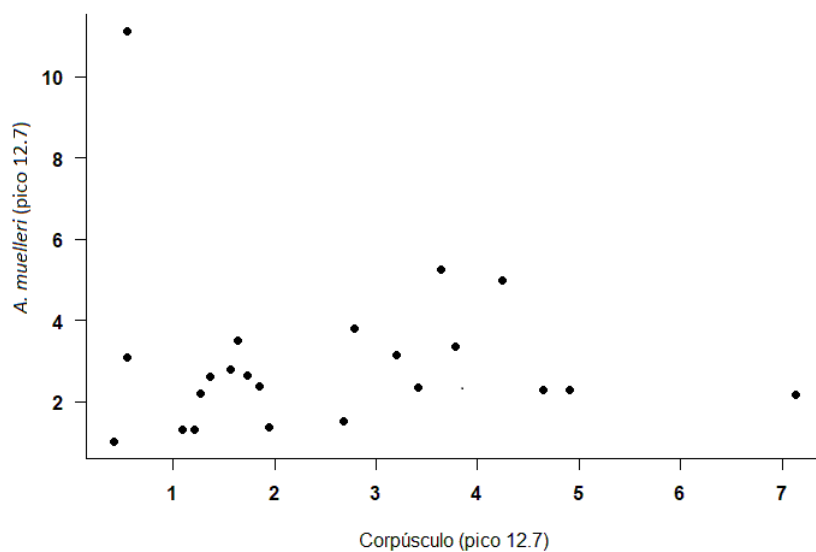
**Figura 6.** Comparação entre as médias de concentração (log) dos picos 12,7 (A) e 14,4 (B) corpúsculos mullerianos quanto aos locais MP (Mata do Paraíso), MB (Mata da Biologia), SZ (Mata do Seu Zé). As letras indicam diferença entre as médias (Teste de Tukey). Não houve diferença entre as médias de concentrações dos picos entre os três locais. (A) (N=33,  $F_{2,30}=1.1239$ ;  $p=0.33$ ), (B) (N=33,  $F_{2,30}=1.9368$ ;  $p=0.16$ ).

### 3.2.2 Similaridade química entre operárias, fungo e corpúsculos

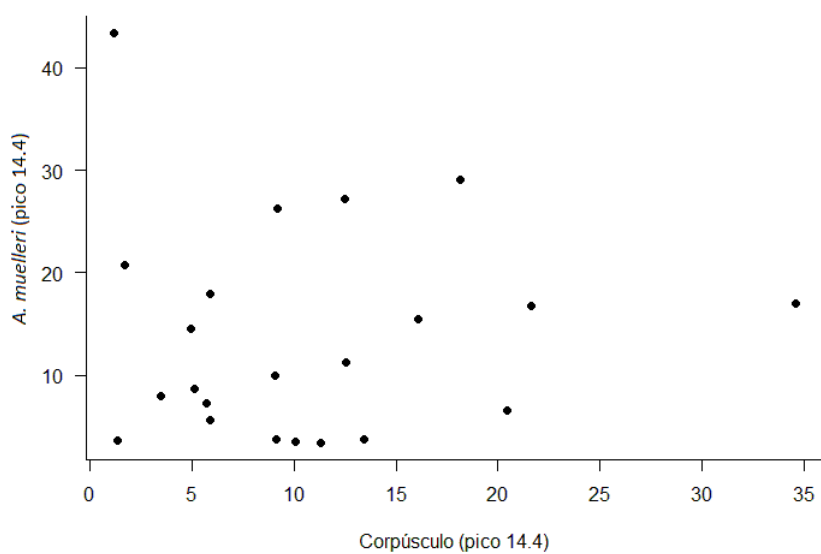
Nossos resultados demonstraram que não há relação entre a concentração dos picos 12,7 (Figura 7,  $F_{1,20}=0.165$ ;  $p=0.689$ ;  $R^2=0.008$ ) e 14,4 (Figura 8,  $F_{1,20}=0.0225$ ,  $p=0.882$ ,  $R^2=0.001$ ) provenientes dos corpúsculos de *Cecropia* e *A. muelleri*. No entanto, ao relacionarmos as concentrações dos 27 picos similares entre o fungo e *A. muelleri* encontramos uma relação positiva e significativa em três deles: pico 15,7 (Figura 9,  $F_{1,20}=5.8712$ ;  $p=0.025$ ;  $R^2=0.227$ ), pico 20 (Figura 10,  $F_{1,20}=10.406$ ;  $p=0.004$ ;  $R^2=0.342$ ) e pico 20,99 (Figura 11,  $F_{1,20}=7.8745$ ;  $p=0.045$ ,  $R^2=0.186$ ).

**Tabela 1.** Tabela de significância para análise de regressão linear para concentração (log) dos picos de operárias em função do fungo (*A. muelleri*~Chaetothyriales) e operárias em função corpúsculo (*A. muelleri*~Corpúsculo).

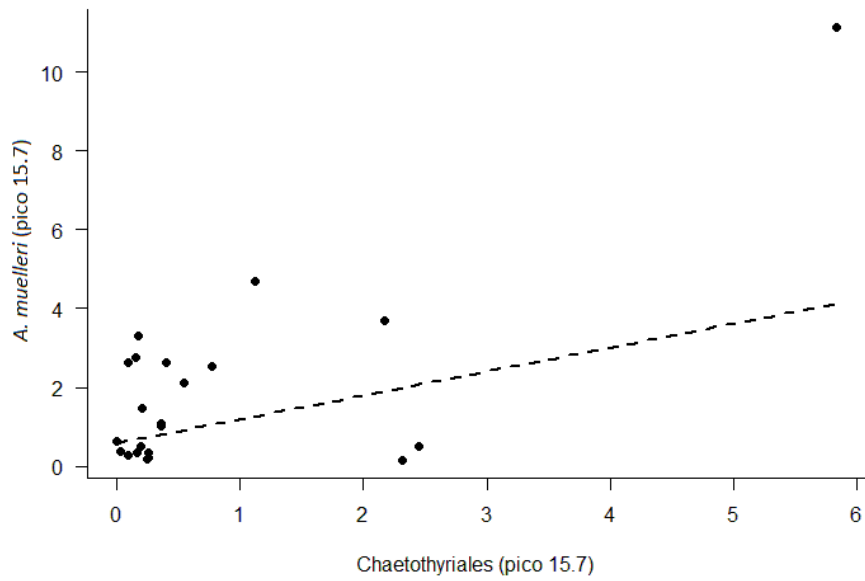
Cód.	<i>A. muelleri</i> ~Fungo			<i>A. muelleri</i> ~Corpúsculo	
	RT	Valor de P	R <sup>2</sup>	Valor de P	R <sup>2</sup>
1	12,7	0,058	0,168	0,689	0,008
2	14	0,191	0,084	--	--
3	14,4	0,558	0,017	0,8821	0,001
4	14,6	0,981	0,000	--	--
5	15,6	0,337	0,046	--	--
<b>6</b>	<b>15,7</b>	<b>0,025*</b>	<b>0,227</b>	--	--
7	15,9	0,554	0,018	--	--
8	16,6	0,450	0,029	--	--
9	16,9	0,457	0,028	--	--
10	17,4	0,748	0,005	--	--
11	17,5	0,164	0,095	--	--
12	17,6	0,682	0,009	--	--
13	17,9	0,247	0,066	--	--
14	19,1	0,772	0,004	--	--
15	19,2	0,757	0,005	--	--
16	19,5	0,068	0,157	--	--
17	19,9	0,390	0,037	--	--
<b>18</b>	<b>20</b>	<b>0,004*</b>	<b>0,342</b>	--	--
29	20,1	0,160	0,096	--	--
20	20,9	0,204	0,079	--	--
<b>21</b>	<b>20,99</b>	<b>0,045*</b>	<b>0,186</b>	--	--
22	21,1	0,607	0,013	--	--
23	21,4	0,126	0,113	--	--
24	23,3	0,075	0,150	--	--
25	23,4	0,172	0,091	--	--
26	23,6	0,736	0,006	--	--
27	24,1	0,568	0,017	--	--



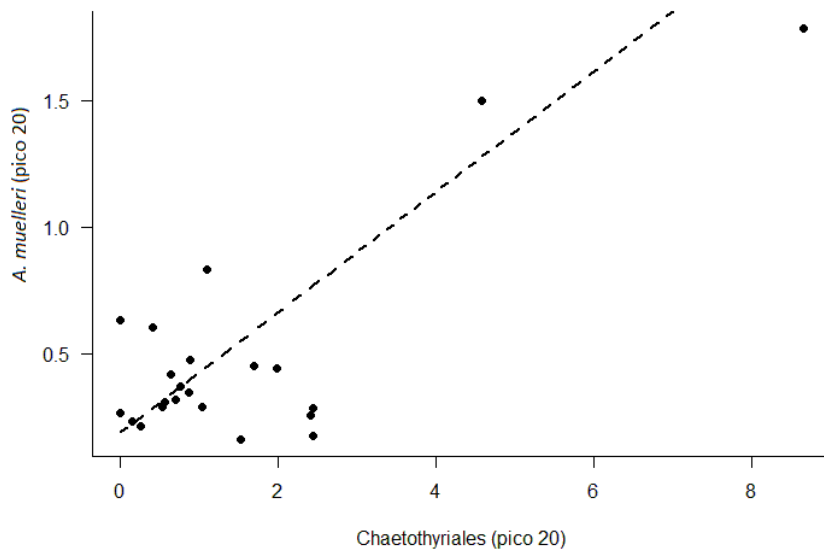
**Figura 7.** Relação entre a concentração (log) para o pico 12,7 de operárias *A. muelleri* e do pico 12,7 de corpúsculos mullerianos. O pico 12,7 de corpúsculos não influenciam a determinação do pico 12,7 em *A. muelleri* (N=22,  $p=0.689$ ,  $R=0.008$ ).



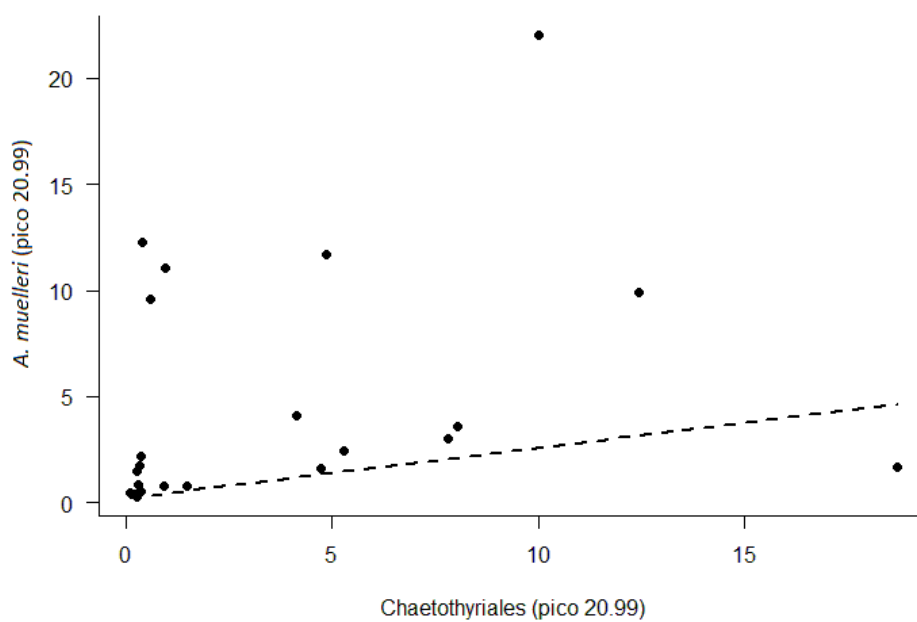
**Figura 8.** Relação entre a concentração (log) para o pico 14,4 de operárias *A. muelleri* e do pico 14,4 de corpúsculos mullerianos. O pico 14,4 de corpúsculos não influencia a determinação do pico 14,4 em *A. muelleri* (N=22,  $p=0.882$ ,  $R^2=0.001$ ).



**Figura 9.** Relação entre a concentração (log) para o pico 15,7 de operárias *A. muelleri* e do pico 15,7 de fungo Chaetothyriales. O pico 15,7 de fungos influencia a determinação do pico 15,7 em *A. muelleri* (N=22,  $p=0.025$ ;  $R^2=0.227$ ).



**Figura 10.** Relação entre a concentração (log) para o pico 20 de operárias *A. muelleri* e do pico 20 de fungo Chaetothyriales. O pico 20 de fungos influencia a determinação do pico 20 em *A. muelleri* (N=22,  $p=0.004$ ;  $R^2=0.342$ ).



**Figura 11.** Relação entre a concentração (log) para o pico 20.99 de operárias *A. muelleri* e do pico 20.99 de fungo Chaetothyriales. O pico 20.99 de fungos influencia a determinação do pico 20.99 em *A. muelleri* (N=22, p=0.045, R<sup>2</sup>=0.186).

#### 4. Discussão

Nesta dissertação focamos na similaridade química da formiga *Azteca muelleri* com os seus simbiontes a planta *Cecropia glaziovii* e o fungo Chaetothyriales e uma de suas parentes mais próximas *Azteca chartifex*. A partir disso, através das análises qualitativas e quantitativas de compostos cuticulares, detectamos que as folhas de *C. glaziovii*, seus corpúsculos e também *A. chartifex* parecem apresentar menor similaridade química com as operárias de *A. muelleri* do que seu fungo simbionte. Esse resultado, pode indicar maior relevância do fungo na determinação do perfil químico das operárias de *A. muelleri*. Uma vez que além de possuírem todos os componentes presentes na cutícula das operárias também tiveram picos que possuíram uma relação positiva com os da formiga (figura 9, 10 e 11).

Dos compostos cuticulares encontrados, alcanos, metil-alcanos e alcenos, 24 correspondem a hidrocarbonetos que estão associados ao reconhecimento químico em colônias (LOCKEY, 1988; MARTIN; DRIJFHOUT, 2009; FOURNIER et al., 2016; NEUPERT et al., 2018). Os n-alcanos e metil-alcanos são amplamente distribuídos em cutículas de insetos estando relacionados a impermeabilidade à água e agente antidessecante, e talvez por essa razão são encontrados em espécies de formigas mais basais. Já os alcenos ainda carecem de informação devido ausência de informação sobre a influência da posição das duplas ligações no reconhecimento (MARTIN; DRIJFHOUT, 2009).

Esses resultados se tornam intrigantes quando consideramos de que forma esses compostos cuticulares das operárias de *A. muelleri* podem ser influenciados pelo corpúsculo, fungo ou folhas da planta. Em primeira análise, formulamos a explicação de que esses compostos poderiam estar sendo transmitidos por contato da superfície da folha, do corpúsculo ou do fungo. No entanto, essa ideia parece pouco viável quando consideramos o processo de formação da cutícula. Em insetos, a cutícula é formada por via endógena através de células especializadas, os oenócitos (CHAPMAN, 2013). Uma vez produzidos nessas células, os hidrocarbonetos podem ser transferidos por lipoforinas através da hemolinfa dos insetos (CHAPMAN, 2013).

Outra explicação seria a de que os compostos cuticulares são transferidos principalmente por via trófica por meio da ingestão de fungos. A alimentação por fungo é sugerida em espécies de formigas que se abrigam em domácia, pois os fungos Chaetothyriales que vivem em neste local tendem a possuir parede celular menos espessa facilitando a alimentação pelas formigas. Isto é, espécies de fungo em domácias são

recurso alimentar em potencial para formigas mirmecófitas (VOGLMAYR et al., 2011; PRINGLE; MOREAU, 2017). Um reforço teórico em favor da maior importância da alimentação sobre o perfil de hidrocarbonetos foi dado por Silverman e Liang (2000). Nesse trabalho, foi demonstrado que a espécie de formiga *Linepitema humile* incorpora seus hidrocarbonetos de cutícula principalmente de suas presas: duas espécies de baratas.

Essa transferência de hidrocarbonetos de fungos para as operárias parece fazer ainda mais sentido quando observamos que na formigas cultivadoras de fungo *Atta sexdens* também foi registrado que as operárias possuem perfil de cutícula similar ao do fungo simbiote *Leucoagaricus gonylophorus* (VALADARES; NASCIMENTO, 2015; VALADARES; NASCIMENTO, 2016; VALADARES; NASCIMENTO, 2017).

Como no sistema *Azteca-Cecropia* o fungo participa da alimentação das larvas na fundação da colônia, uma vez que as primeiras operárias ainda não surgiram, (MAYER et al., 2018), o corpúsculo talvez atue tardiamente na alimentação após o estabelecimento da colônia, quando a coleta nas triquílias se torne possível (MAYER et al., 2018). Desse modo, é possível que o corpúsculo sirva de variação secundária no perfil de hidrocarbonetos, uma vez que a cutícula continua em processo de renovação ao longo da vida das operárias (MARTIN; DRIJFHOUT, 2009; MAYER et al., 2018).

O fato dos perfis de hidrocarbonetos poderem variar no tempo pode explicar porque houve perda da relação entre os demais compostos que são similares, admitindo que talvez a alimentação pelo fungo só ocorresse no início da fundação da colônia e que depois esse perfil fosse aos poucos se distanciando do perfil do fungo Chaetothyrales (ESPELIE; CHAPMAN; SWORD, 1994; NATION, 2008).

Mais ainda, o perfil de compostos cuticulares encontrados em *Azteca chartifex* neste trabalho indicam que a história filogenética pode não responder com muita fidedignidade a origem dos perfis químicos, podendo originar equívocos na formação de filogenias que levem em consideração apenas hidrocarbonetos como fator de agrupamento, o que não invalida, no entanto, essa ferramenta na separação de espécies crípticas (KATHER; MARTIN, 2012; BRAGA et al., 2013).

## **5. Conclusão**

A espécie de formiga *Azteca muelleri* possui uma maior similaridade química com seu fungo simbiote do que com sua planta hospedeira, e dessa forma o fungo parece ter relação mais estreita na transferência de compostos de cuticulares para a formiga, possivelmente por via trófica. Esse trabalho é o primeiro estudo químico no clássico

sistema entre formigas e plantas mirmecófitas (HEIL; MCKEY, 2003), e indica que os hidrocarbonetos de cutícula em formigas são mais relacionados com o alimento ingerido do que outros aspectos ambientais ou filogenéticos. No entanto, são necessários mais estudos para melhor compreender a influência dos fatores ambientais em detrimento da filogenia para a formação dos hidrocarbonetos cuticulares em insetos.

## Referências

- BERG, C. C.; ROSSELLI, P. F. **Cecropia**. 2005. v. 37.
- BRAGA, M. V. et al. Cuticular hydrocarbons as a tool for the identification of insect species: Puparial cases from Sarcophagidae. **Acta Tropica**, v. 128, n. 3, p. 479–485, 2013. .
- BUCZKOWSKI, G. et al. Diet-related modification of cuticular hydrocarbon profiles of the argentine ant, *Linepithema humile*, diminishes intercolony aggression. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 4, p. 829–843, 2005.
- CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and funtion**. 5. ed. United Kingdom: Cambridge university press, 2013.
- DAVIDSON, D. W. Symbiosis of ants with *Cecropia* as a function of light regime. **Antplant interactions**, p. 289–309, 1991.
- DEJEAN, A. et al. Nest site selection and induced response in a dominant arboreal ant species. **Naturwissenschaften**, v. 95, n. 9, p. 885–889, 2008.
- DEL-CLARO, K.; BERTO, V.; RÉU, W. Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). **Journal of Tropical Ecology**, 1996.
- ESPELIE, K.; CHAPMAN, R. F.; SWORD, G. A. Variation in the surface lipids of the grasshopper, *Schistocerca americana* (Drury). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, n. 6, p. 563–575, 1994.
- FISCHER, D. C. H. Fundamentos de cromatografia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 2006.
- FOURNIER, D. et al. Social structure and genetic distance mediate nestmate recognition and aggressiveness in the facultative polygynous ant *Pheidole pallidula*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–20, 2016.
- FRIZZI, F. et al. The rules of aggression: How genetic, chemical and spatial factors affect intercolony fights in a dominant species, the mediterranean acrobat ant *Crematogaster scutellaris*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–16, 2015.
- GUILLEM, R. M.; DRIJFHOUT, F. P.; MARTIN, S. J. Species-Specific Cuticular Hydrocarbon Stability within European *Myrmica* Ants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 42, n. 10, p. 1052–1062, 2016.
- HEIL, M.; MCKEY, D. Protective Ant-Plant Interactions as Model Systems in Ecological and Evolutionary Research. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 34, n. 1, p. 425–553, 2003.

- JANZEN, D. H. Coevolution of mutualism between ants and acacias in central america. **Evolution**, v. 20, n. 3, p. 249–275, set. 1966.
- KATHER, R.; MARTIN, S. J. Cuticular hydrocarbon profiles as a taxonomic tool: Advantages, limitations and technical aspects. **Physiological Entomology**, v. 37, n. 1, p. 25–32, 2012.
- LOCKEY, K. H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and**, v. 89, n. 4, p. 595–645, 1988.
- MARTIN, S.; DRIJFHOUT, F. A review of ant cuticular hydrocarbons. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 10, p. 1151–1161, 2009.
- MAYER, V. E. et al. Transmission of fungal partners to incipient *Cecropia*-tree ant colonies. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–17, 2018.
- NATION, J. L. **insect physiology and biochemistry**. [S.l: s.n.], 2008.
- NEUPERT, S. et al. Learning distinct chemical labels of nestmates in ants. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, n. August, p. 1–12, 2018.
- PRINGLE, E. G.; MOREAU, C. S. Community analysis of microbial sharing and specialization in a Costa Rican ant – plant – hemipteran symbiosis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1850, 2017.
- RICKSON, F. R. Anatomical development of the leaf trichilium and mullerian bodies of *Cecropia peltata* L. **American Journal of Botany**, v. 63, n. 9, p. 1266, 1976a.
- \_\_\_\_\_. Glycogen plastids in müllerian body cells of *Cecropia peltata* - A higher green plant. **Science**, v. 173, n. 3994, p. 344–347, 1971.
- \_\_\_\_\_. Ultrastructural Differentiation of the mullerian body glycogen plastid of *Cecropia peltata* L. **American Journal of Botany**, v. 63, n. 9, p. 1272, 1976b.
- SILVERMAN, D.; LIANG, J. “You are what you eat”: diet modifies cuticular hydrocarbons. **Naturwissenschaften**, v. 87, p. 412–416, 2000.
- TEAM, R. C. A language and environment for statistical computing. v. 201, 2013.
- VALADARES, L.; DO NASCIMENTO, F. S. Changes in the cuticular hydrocarbon profile associated with the molting cycle correlate with the hydrocarbon profile of the fungus cultivated by the ant *Atta sexdens*. **Insectes Sociaux**, v. 64, n. 4, p. 591–596, 2017.
- VALADARES, Lohan; NASCIMENTO, D.; NASCIMENTO, F. S. Foliar substrate affects cuticular hydrocarbon profiles and intraspecific aggression in the leafcutter ant *Atta sexdens*. **Insects**, v. 6, n. 1, p. 141–151, 2015.
- VALADARES, Lohan; NASCIMENTO, F. S. do. Chemical cuticular signature of leafcutter ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae) worker subcastes. **Revista**

**Brasileira de Entomologia**, v. 60, n. 4, p. 308–311, 2016.

VELOSO, H. P. **Classificação da Vegetação Brasileira, Adaptada a um Sistema Universal**. [S.l: s.n.], 1991.

VOGLMAYR, H. et al. The diversity of ant-associated black yeasts: Insights into a newly discovered world of symbiotic interactions. **Fungal Biology**, v. 115, n. 10, p. 1077–1091, 2011.