

Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)
Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade

**Influência da Aplicação Tópica de Hormônio Juvenil em Larvas e
Adultos Sobre a Assinatura Química de *Mischocyttarus consimilis*
(Vespidae: Polistinae)**

Dourados - MS

Fevereiro - 2016

Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)
Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade

**Influência da Aplicação Tópica de Hormônio Juvenil em Larvas e
Adultos Sobre a Assinatura Química de *Mischocyttarus consimilis*
(Vespidae: Polistinae)**

Aluna: Erika Fernandes Neves

Orientador: Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Humberto da Cunha Andrade

Dourados - MS
Fevereiro – 2016

Influência da Aplicação Tópica de Hormônio Juvenil em Larvas e Adultos Sobre a Assinatura Química de *Mischocyttarus consimilis* (Vespidae: Polistinae)

Aluna: Erika Fernandes Neves

Orientador: Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Humberto da Cunha Andrade

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Entomologia e Conservação da Biodiversidade.

Dourados - MS
Fevereiro – 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

N511i	Neves, Erika Fernandes. Influência da aplicação tópica de hormônio juvenil em larvas e adultos sobre a assinatura química de <i>Mischocyttarus consimilis</i> (Vespidae: Polistinae). / Erika Fernandes Neves. – Dourados, MS: UFGD, 2016. 81f. Orientador: Prof. Dr. William Fernando Antonialli Júnior. Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados. 1. Química cuticular. 2. Comportamento. 3. Vespas sociais. I. Título.
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

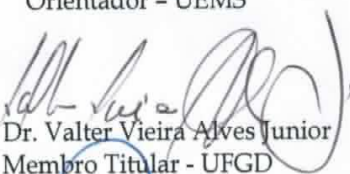
**“INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO TÓPICA DE HORMÔNIO JUVENIL EM
LARVAS E ADULTOS SOBRE A ASSINATURA QUÍMICA DE
Mischocyttarus consimilis (VESPIDAE: POLISTINAE)”**

Por

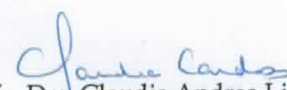
ERIKA FERNANDES NEVES

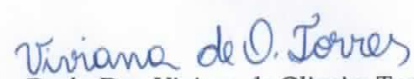
Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTOR EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação


Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior
Orientador - UEMS


Prof. Dr. Valter Vieira Alves Junior
Membro Titular - UFGD


Prof. Dr. Wedson Desiderio Fernandes
Membro Titular - UFGD


Profa. Dra. Claudia Andrea Lima Cardoso
Membro Titular - UEMS


Profa. Dra. Viviana de Oliveira Torres
Membro Titular - UEMS

Aprovada em: 29 de fevereiro de 2016.

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha família pelo

Incentivo, dedicação e carinho.

Epígrafe

"Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano ele treme de medo.
Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas,
o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados,
e vê à sua frente um oceano tão vasto,
que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre.
Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar.
Ninguém pode voltar.
Voltar é impossível na existência.
Você pode apenas ir em frente.
O rio precisa se arriscar e entrar no oceano.
E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece.
Porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano,
mas tornar-se oceano.
Por um lado é desaparecimento,
e por outro lado é renascimento.
Assim somos nós.
Só podemos ir em frente e arriscar.

OSHO

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus pela minha vida e por guiar meus passos para conclusão desse trabalho.

À minha família pelo incentivo e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior, por nunca medir esforços em me ajudar, por acreditar que no meu trabalho, pela paciência, amizade e incentivo.

Aos professores; Dr. Sandro Márcio Lima, e Dr. Luiz Humberto da Cunha Andrade, e a professora Dr. Claudia Andréa Lima Cardoso pela paciência e generosidade em sempre me receber e me ajudarem com as análises químicas.

Ao Dr. Yzel Rondon Suárez pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos professores; Dr. Valter Alves Vieira Junior, o professor Dr. Wedson Wedson Desidério Fernandes, Dr. Claudia Andréa Lima Cardoso, e a Dr. Viviana de Oliveira Torres pela disponibilidade, e gentileza, de participarem da minha banca dando contribuições valiosas para esse trabalho.

Ao Dr. Thiago Montagna pela orientação na coleta de dados, sugestões e pela amizade.

A Família LABECO por todo incentivo, ajuda, conselhos, e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos.

A todos os meus amigos e colegas que sempre estiveram ao meu lado durante essa caminhada, em especial aquelas pessoas que sempre estiveram presentes nos bons e maus momentos me incentivando e dando conselhos; Benedito Adelino dos Santos Filho, Aline Câmara Zampieri, Angélica Mendonça, Michelle Castro de Paula, Luiz Carlos Sabotto, Samir de Olivera Kassab, Thiago Alexandre Mota e Vera Alves de Sá;

Ao Programa de Pós Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade pela Bolsa de doutorado e pela orientação sempre que necessário;

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul pelo apoio técnico;

Ao Fundect e ao CNPQ pelo apoio financeiro para realização desse trabalho;

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na elaboração desse trabalho, concerteza sem cada um de vocês tudo seria muito mais difícil.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

Resumo Geral	xi
Abstract	xii
Introdução Geral	02
Revisão de Literatura	12
1.1. Hidrocarbonetos cuticulares funcionam como “digital” química para insetos sociais.	12
1.2. Hormônio Juvenil e seu papel no comportamento e status reprodutivos dos insetos sociais	15
1.3. Hormônio Juvenil e sua relação com determinação de castas e assinatura química cuticular em insetos sociais	17
2. Objetivo Geral	19
3. Referências Bibliográficas	20
 Capítulo I - Efeito da aplicação tópica de Hormônio Juvenil em larvas sobre a composição química cuticular e sinais visuais da face de fêmeas adultas de <i>Mischocyttarus consimilis</i> (Vespidae: Polistinae)	 28
 Capítulo II - Efeito da aplicação tópica de Hormônio Juvenil em fêmeas recém emergidas da vespa social <i>Mischocyttarus consimilis</i> (Vespidae: Polistinae)	 57
 Considerações Finais	 81

Resumo Geral

A vida dos insetos sociais é mediada por inúmeros sinais que podem ser visuais, sonoros e químicos. Esses sinais são utilizados como mediadores do comportamento e são influenciados por diversos fatores, dentre os quais merece destaque o Hormônio Juvenil que é considerado o elemento chave em muitos processos da vida social dos insetos sendo que seus efeitos são decisivos na determinação de casta pré-imaginal e na fisiologia e ontogenia comportamental de fêmeas de vespas adultas. Contudo, ainda são raros os estudos que tenham explorado este tema em vespas sociais de fundação independente. Desta maneira este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da aplicação tópica de Hormônio Juvenil em larvas e fêmeas recém emergidas de *Mischocyttarus consimilis* sobre parâmetros que comprovam seu papel na determinação de castas pré-imaginal e na ontogenia comportamental de adultos. Foram realizadas aplicações tópicas de Hormônio Juvenil em larvas de diferentes instares a fim de avaliar o momento mais sensível cuja elevação das taxas do hormônio pode produzir efeitos significativos sobre os perfis químicos cuticulares e sinais de reconhecimento visuais das faces. Além disto, foram avaliados os efeitos desse hormônio sobre sua fisiologia e compostos químicos cuticulares quando aplicado em fêmeas recém emergidas. Os resultados fornecem evidências de que em espécies de vespas sociais de fundação independente a determinação de casta pode ser, ao menos em parte, pré-imaginal, uma vez que os efeitos da aplicação de HJ na fase larval pode alterar o fenótipo de adultos recém emergidos, sua química cuticular e padrões de reconhecimento visual das faces. Outro aspecto importante é de que o efeito instar dependente aponta o 3^o e 4^o instares, como aqueles mais sensíveis a elevação dos níveis normais de Hormônio Juvenil. Seus efeitos em fêmeas adultas também foram significativos alterando sua fisiologia que por consequência altera seu comportamento e por fim, os compostos químicos da cutícula que sinalizam seus papéis dentro da colônia. Portanto, estes resultados demonstram que níveis de Hormônio Juvenil são tão decisivos para organização de colônias de espécies de fundação independente, como já tem sido comprovado em vespas mais derivadas, fornecendo dados que permitam melhor compreensão da evolução do comportamento social neste grupo de insetos.

PALAVRAS- CHAVE: Química cuticular; comportamento; fisiologia; Vespas sociais.

Abstract

The life of insects is mediated for numerous signals can be visual, audible and chemical. These signals are used as behavioral mediators and are influenced for several factors, among which stand out the the Juvenile Hormone (JH) that is considerate the key element in many processes of insect social life being that their effects are decisive in determination of pre-imaginal caste and physiology and behavioral ontogeny of social wasps adults. However, the studies which have explored this theme in social wasps of independent foundation are still rare. In this way this study had as purpose evaluate the effects of topic application of Juvenile Hormone in larvae and newly emerged females of *Mischocyttarus consimilis* on parameters that prove their role in determination of pre-imaginal caste and and behavioral ontogeny of adults. Topic Applications of JH were realized in larvae of different instars in order to evaluate the most sensitive time which elevation of hormone titles can produce effects more significant on cuticular chemical profiles and signals of optical character recognition of faces. Besides, the effects when applied in newly emerged females on their physiology and cuticular chemical compounds were evaluated. The results provide more evidences of that in species of social wasps of independent foundation the caste determination can be, at least in part, pre-imaginal, since the effects of JH application in larval stage can change the phenotype of newly emerged adults, its cuticular chemical and measure of optical character recognition of faces. The results provide more evidences of that in species of social wasps of independent foundation the caste determination can be, at least in part, pre-imaginal, since the effects of JH application in larval stage can change the phenotype of newly emerged adults, its cuticular chemical and measure of optical character recognition of faces. Another important feature is that the dependent instar effect indicates the 3⁰ and 4⁰ instars as those more sensitive to elevated of normal levels of JH. Their effects in adult females also were significant changing its physiology that consequently changes its behavior and finally the chemical compounds of the cuticle that signal their roles within the colony. Therefore, this results show that JH levels are so crucial to organizing of colonies of species independent foundation, as has been proven in more derived wasps, providing data to enable better understanding of the evolution of social behavior in this group of insects.

KEY WORDS: Cuticular chemistry; behavior; physiology; social wasps

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Esboço esquemático do abrigo artificial usado para a manutenção da colônia. (retirado de Montagna et al., 2015).

Figura 2. Curva média para cada grupo de espectros de absorção no infravermelho médio de *Mischocyttarus consimilis* submetidas à aplicação de Hormônio Juvenil em diferentes instares larvais pela técnica de FTIR-PAS com indicação dos picos utilizados na análise estatística.

Figura 3. Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação em diferentes instares larvais de *Mischocyttarus consimilis* submetidas a aplicação de Hormônio Juvenil e o grupo controle analisados pela técnica de FTIR-PAS.

Figura 4. Cromatogramas representativos dos instares larvais submetidos à aplicação de Hormônio Juvenil (3^o, 4^o e 5^o instares) e o controle, com indicação dos 10 compostos que foram estatisticamente mais significativos para separação dos grupos

Figura 5. Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação em diferentes instares larvais de *Mischocyttarus consimilis* submetidas a aplicação de Hormônio Juvenil e o grupo controle analisados pela técnica de CG-EM.

Figura 6. Abundância relativa em porcentagem dos compostos identificados para cada instar submetido à aplicação de Hormônio Juvenil e o grupo controle analisados por CG-EM de *Mischocyttarus consimilis*.

Figura 7. Esquema das cabeças com destaque as medidas utilizadas, em preto a largura máxima da cabeça (mm), e em vermelho a área com a área da mancha medida (mm²) de *Mischocyttarus consimilis*.

Figura 8. Faces das fêmeas de *Mischocyttarus consimilis* submetidas à aplicação de HJ nos 3^o, 4^o e 5^o instar, controle e rainha mostrando as diferenças de formatos de cabeça.

Figura 9. Box- Plot com a largura média da cabeça nos diferentes grupos de fêmeas *Mischocyttarus consimilis*

Capítulo II

Figura 1. Frequência relativa dos atos comportamentais executados por fêmeas de *M. consimilis* jovens e velhas sob efeito dos diferentes tratamentos e controle.

Figura 2. Comprimento médio dos ovócitos de fêmeas de *M. consimilis* sob efeito dos diferentes tratamentos e controle analisados pela Análise de Variância (ANOVA).

Figura 3. Curva média para cada grupo de espectros de absorção no infravermelho médio dos compostos cuticulares de fêmeas de *Mischocyttarus consimilis* sob efeito dos diferentes tratamentos e controle avaliados pela técnica de FTIR-PAS com indicação dos picos utilizados na análise estatística.

Figura 4 Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação em fêmeas de *Mischocyttarus consimilis* submetidas a aplicação de Hormônio Juvenil, acetona e o grupo controle analisados pela técnica de FTIR-PAS.

Figura 5. Cromatogramas representativos dos compostos cuticulares das fêmeas recém emergidas sob efeito dos diferentes tratamentos e controle com indicação dos 11 compostos que foram estatisticamente mais significativos para separação dos grupos.

Figura 6. Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação em fêmeas de *Mischocyttarus consimilis* submetidas à aplicação de Hormônio Juvenil, acetona e o grupo controle analisados pela técnica de CG-EM.

Figura 7. Abundância relativa em porcentagem dos compostos identificados na cutícula das fêmeas de *M. consimilis* sob efeito dos diferentes tratamento e controle por CG-EM.

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Número de onda, coeficientes das duas raízes canônicas, grupo funcional, e modo vibracional dos picos identificados nos espectros de absorção no infravermelho médio dos tórax das vespas submetidas à aplicação de HJ em diferentes instares larvais e analisados por FTIR-PAS.

Tabela 2. Médias da proporção relativa e seus desvios-padrão para os compostos cuticulares identificados nos diferentes instares larvais que foram submetidos a aplicação de HJ o grupo controle em *Mischocyttarus consimilis* com destaque aos compostos majoritários analisados por CG-EM.

Tabela 3. Compostos que apresentaram valores estatisticamente significativos com destaque nos 10 mais significativos para a separação dos diferentes instares larvais que receberam tratamento com HJ e controle da espécie *Mischocyttarus consimilis* analisados por CG-EM.

Tabela 4: Matriz das diferenças médias dos pares analisados pela ANCOVA da diferenciação facial dos grupos tratados com HJ nos 3^o, 4^o e 5^o instares larvais, grupo controle e rainhas de *Mischocyttarus consimilis*.

Capítulo II

Tabela 1. Matriz das diferenças médias dos pares analisados pelo teste de Tukey do comprimento médio dos ovócitos de fêmeas recém emergidas com aplicação de HJ, fêmeas tratadas com Acetona e grupo controle de *Mischocyttarus consimilis*

Tabela 2. Número de onda, coeficientes das duas raízes canônicas, grupo funcional, e modo vibracional dos picos identificados nos espectros de absorção no infravermelho médio da cutícula das fêmeas de *M. consimilis* sob efeito dos diferentes tratamentos e controle por FTIR-PAS.

Tabela 3. Médias da proporção relativa e seus desvios-padrão para os compostos cuticulares

identificados nos grupos de fêmeas submetidas à aplicação de hormônio juvenil, acetona e grupo controle em *Mischocyttarus consimilis* com destaque aos compostos majoritários analisados por CG-EM.

Tabela 4. Compostos que apresentaram valores estatisticamente significativos com para a separação dos grupos controle, de tratamento com acetona e com Hormônio juvenil em recém emergidos da espécie *Mischocyttarus consimilis*.

Introdução Geral

Introdução Geral

Os insetos considerados eussociais são definidos por apresentarem divisão de trabalho reprodutivo, cuidado cooperativo com a prole e sobreposição de gerações, sendo que, nos mais derivados ocorre a casta reprodutiva que se distingue da casta operária estéreis morfológicamente, sendo que nestas a determinação de castas é pré-imaginal, ou seja, ocorrendo ainda no estágio larval (Wilson 1971), diferentemente do que ocorre nas de fundação independente, nos quais, se pensava até recentemente que a determinação de castas seria pós-imaginal, ao menos na maioria dos casos (West-Eberhard 1978; 1981).

A determinação de castas em vespas sociais é, de fato, um assunto controverso, entretanto, vários estudos demonstram que dependendo do grupo ela é ocorra basicamente por uma das formas, trófica ou comportamental (O'Donnell 1998). Em vespas sociais consideradas "altamente" eussociais ou mais derivadas (i. e. Vespinae), a determinação de castas é trófica, com diferenciação morfofisiológica evidente entre rainhas e operárias e esta divergência física entre rainhas e operárias se deve basicamente a diferenças nutricionais durante o estágio larval (Wheeler 1986; Hunt 1991; 1994; 2002). Da mesma maneira, outros estudos demonstram que fêmeas de vespas sociais que sofrem deficiência nutricional no estágio larval, tornam-se adultos com ovários não desenvolvidos (Ishay 1975). De fato, a determinação de castas pré-imaginal tem sido documentada em Epiponini, por meio de estudos baseados em parâmetros morfométricos (Hunt et al., 1996; Jeanne 1996).

Portanto, em vespas Polistinae a ausência de diferenças morfológicas entre rainhas funcionais e operárias é frequentemente citada como evidências de determinação de casta pós-imaginal (Jeanne 1972; Gadgil e Mahabal 1974; Haggard e Gamboa, 1980; Turillazzi 1980; Solís e Strassmann 1990; Mead e Gabouriaut 1993; O'Donnell 1998), sugerindo que a divisão reprodutiva de trabalho se defina durante a fase adulta por meio de interações agressivas entre as fêmeas, estabelecendo assim relações de dominância, no qual as fêmeas que sofrem agressões ficam submissas e passam a executar trabalhos característicos da casta operária (Gadagkar et al., 1991).

Dentro de uma proposta de diferenciação de casta pós-imaginal, Jeanne (1972), por exemplo, sugere que fêmeas dominantes em colônias de *Mischocyttarus drewseni* ocorrem na colônia, em um dado momento, em função da densidade colonial, demonstrando que fêmeas com maior potencial para dominância são produzidas quando

as colônias apresentam alta densidade de adultos. Mead e Gabouriaut (1993) demonstraram que fêmeas recém-emergidas transferidas de colônias, em fase de operárias, para colônias maduras têm sua expectativa de vida aumentada e expressam características comportamentais de fêmeas dominantes. Hagiwara e Kojima (2002) também demonstraram experimentalmente que fêmeas reprodutivas em colônias de *Polistes nipponensis* podem ocorrer na ausência da fêmea dominante em colônias na fase de operárias.

Ainda que o entendimento dos mecanismos controladores da determinação de casta em vespas sociais de fundação independente seja escasso, já existem evidências da determinação de casta pré-imaginal nesse grupo (Bohm 1972; Pardi e Marino-Piccioli 1981; Rossi e Hunt 1988; Gadagkar et al., 1988; Gadagkar et al., 1991; Wenzel 1992; Hunt et al., 1996; Keeping 2002; Murakami e Shima 2006; Montagna et al., 2015). De fato, as propostas para a determinação de casta pré-imaginal em vespas sociais, baseiam-se em padrões de dimorfismo que não podem ser explicados por crescimento alométrico, levantando assim, a hipótese de programação ou reprogramação de parâmetros de desenvolvimento durante o período larval (Hunt et al., 1996; Jeanne 1996). Por exemplo, Rossi e Hunt (1988) já demonstraram que a alimentação larval de melhor qualidade em *Polistes metricus*, produz adultos maiores e com alto potencial reprodutivo.

O desenvolvimento de castas férteis ou estéreis e a divisão das tarefas nas colônias dos himenópteros sociais são regulados por fatores endócrinos, entre eles, o principal é o hormônio juvenil (HJ), o qual tem mostrado um importante papel na divisão reprodutiva de trabalho e polietismo temporal (Robinson e Vargo 1997; Hartfelder 2000) como já descritos em trabalhos como os de Bloch et al., (2000) e Bortolotti et al., (2001) com *Bombus terrestris* e de Rembold et al., (1992), com *Apis mellifera*.

De fato, as ações hormonais têm sido alvo de interesse em estudos sobre determinação de castas e mesmo de outros aspectos do comportamento, em insetos sociais, em especial o papel do HJ em vários processos como, por exemplo, na reprodução, regulando a vitelogênese no corpo gorduroso, o consumo de vitelogenina pelos ovários (Tobe e Stay 1985, revisado por Davey 1996), e o comportamento de oviposição (Cayre et al., 1994). Em insetos sociais mais derivados como *Apis mellifera*, diferentes taxas de HJ, fruto de alimentação diferencial na fase larval, é responsável pela determinação de casta (Rembold 1964; Weaver 1974; Beetsma, 1979). Nessa

espécie, as larvas das futuras rainhas apresentam maior taxa de HJ em sua hemolinfa do que as larvas de operárias (Rembold 1987; Rembold et al., 1992).

O papel do HJ como agente fisiológico associado ao processo de determinação de casta, em vespas sociais, já vem sendo explorado por trabalhos como os de Bohm (1972), Roseler (1977) e Giray et al., (2005). Contudo, os efeitos do HJ sobre a determinação de casta em vespas foram explorados em espécies evolutivamente mais derivadas. Em vespas sociais de fundação independente, no entanto, os efeitos são menos conhecidos, sendo que há poucas informações disponíveis que se resumem em retratar os efeitos do HJ sobre o repertório comportamental de adultos (Giray et al., 2005), e recentemente Montagna et al., (2015) mostram evidências de que a aplicação tópica de HJ em larvas pode levar a fêmeas com maior potencial reprodutivo. De fato, Em Polistinae são fortes os indícios da associação do HJ com a regulação da capacidade de reprodução e status de dominância, em *Polistes* (Roseler 1977) e *Ropalidia* (Agrahari e Gadagkar 2003), por exemplo, já foi documentada a influência do HJ tanto para o desenvolvimento ovariano quanto para o estabelecimento de dominância entre as castas.

Outro traço fundamental para o funcionamento da sociedade destes insetos foi o desenvolvimento de mecanismos de comunicação química (Monnin, 2006). Dentre eles uns dos mais expressivos são os compostos químicos que compõem a maior parte da cutícula dos insetos (Hadley e Schultz 1987; Hadley 1994).

Os compostos químicos cuticulares são geralmente relacionados à identificação dos papéis dos indivíduos dentro da colônia, ou seja, a qual casta pertence, quais são os indivíduos geneticamente relacionados, e outras questões comportamentais (Singer et al., 1998). Neste sentido, há diversos trabalhos avaliando o papel dos compostos químicos cuticulares no mecanismo de reconhecimento de pistas (feromônios) em himenópteros sociais (Breed et al., 1998; Vander Meer e Morel 1998; Singer et al., 1998).

Alguns trabalhos já demonstraram que esses compostos além de fornecerem uma espécie de "assinatura química" que é reconhecida pelos membros da colônia (Gamboa et al., 1986; Gamboa 1996) também variam significativamente entre as castas e subcastas de uma mesma colônia (Sledge et al., 2001; Dani et al., 2004; Neves et al., 2012). Outros ainda demonstraram que tais compostos, em operárias não são uniformes e podem variar temporariamente (Nielsen et al., 1999; Cuvillier-Hot et al., 2001), com a dieta (Liang e Silverman 2000; Bernardi et al., 2014) e com sua função na colônia (Kaib et al., 2004; Greene e Gordon 2003).

Por outro lado, Lengyel et al., (2007) sugerem que os compostos químicos cuticulares em himenópteros sociais estão associados intimamente com as taxas de HJ presentes na hemolinfa do indivíduo, sendo responsável pelas mudanças no seu perfil químico e no repertório comportamental na colônia.

Portanto, os hidrocarbonetos cuticulares têm importância fundamental na evolução da sociabilidade nestes insetos, estando envolvidos juntamente com o HJ na determinação de aspectos comportamentais e fisiológicos, sobretudo na distinção de castas (Sledge et al., 2004).

Entretanto os fatores que levam a diferenciação fisiológica e principalmente a divisão de trabalho reprodutivo entre castas de insetos eussociais menos derivados são poucos conhecidos (O'Donnell 1998) e, ainda que a possibilidade de haver determinação de casta reprodutiva pré-imaginal em vespas de sociais de fundação independente já tenha sido explorada por alguns estudos, não há, ainda resultados concretos que confirme isto. Um dos principais motivos é a dificuldade de aplicação de HJ em larvas (Montagna et al., 2015) sendo esse considerado o principal indutor das diferenças entre castas em condições naturais.

Referências Bibliográficas

Agrahari M and Gadagkar R (2003). Juvenile hormone accelerates ovarian development and does not affect age polyethism in the primitively eusocial wasp, *Ropalidia marginata*. *Journal of Insect Physiology*. 49: 217-222.

Bernardi RC, Firmino ELB, Pereira MC, Andrade LHC, Cardoso CAL, Suárez YR, Antonialli-Junior WF, and Lima SM. (2014). Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy as a potential tool in assessing the role of diet in cuticular chemical composition of *Ectatomma brunneum*. *Genetics and Molecular Research*. 13 (4): 10035-10048.

Bohm MK (1972). Effects of environment and juvenile hormone on ovaries of the wasp, *Polistes metricus*. *Journal of Insect Physiology* 18: 1875-1883.

Beetsma J (1979). The process of queen-worker differentiation in the honey bee. *Bee World*, 60: 24-39.

Bloch G, Hefetz A and Kartfelder K (2000). Ecdysteroid titer, ovary status, and dominance in adult worker and queen bumble bees (*Bombus terrestris*). *Journal of Insect Physiology*. 46: 1033-1040.

Bortolotti L, Duchateau, MJ and Sbrenna G (2001). Effect of juvenile hormone on caste determination and colony processes in the bumblebee *Bombus terrestris*, *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 101: 143-158.

Breed MD, Stiller TM and Moor M J (1998). The ontogeny of kin discrimination cues in the honeybee, *Apis mellifera*. *Behavior Genetics*. 18: 439-448.

Cayre M, Strambi C and Strambi A (1994). Neurogenesis in an adult insect brain and its hormonal control. *Nature* 368: 57–59.

Cuvillier-Hot V, Cobb M, Malosse C, and Peeters C (2001). Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *Journal of Insect Physiology*. 47: 485-493.

Dani FR, Foster K R, Zacchi F, Seppa P, Massolo A, Carelli A, Arévalo E, Queller, DC, Strassmann JE and Turillazzi S (2004). Can cuticular lipids provide sufficient information for within-colony nepotism in wasps? *Proceedings Biological science*. 271: 745-753.

Gadagkar R, Vinutha C, Shanubhogue A and Gore AP (1988). Pre-imaginal biasing of caste in a primitively eusocial insect. *Proceedings of the Royal Society of London B* 233: 175-189.

Gadagkar R, Bhagavan S, Chandrashekara K, and Vinutha C (1991). The role of larval nutrition in pre-imaginal biasing of caste in the primitively eusocial wasp *Ropalidia marginata* (Hymenoptera, Vespidae). *Ecological Entomology* 16: 435-440.

Gadgil M and Mahabal A (1974). Caste differentiation in the paper wasp *Ropalidia marginata* (Lep.). *Current Science* 43: 482.

Gamboa GJ (1996). Kin recognition in social wasps. In: *Natural history and evolution of paper-wasps* (Turillazzi S and West-Eberhard MJ, eds.). Oxford University Press, Oxford. 161-177.

Gamboa GJ, Reeve HK and Pfenning DW (1986). The evolution and ontogeny of nestmate recognition in social wasps. *Annual Review of Entomology*. 31: 431-454.

Giray T, Giovanetti M and West-Eberhard MJ (2005). Juvenile hormone, reproduction, and worker behavior in the neotropical social wasp *Polistes canadensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102: 3330-3335.

Greene MJ and Gordon DM (2003). Social insects—cuticular hydrocarbons inform task decisions. *Nature*. 423: 32

Hadley NF and Schultz TD (1987). Water loss in three species of tiger beetles (*Cicindela*): Correlations with epicuticular hydrocarbons. *Journal of Insect Physiology*. 33: 677-682.

Hadley N. F (1994). *Water Relations of Terrestrial Arthropods*. Academic Press, Diego, USA.

Haggard CM and Gamboa GJ (1980). Seasonal variation in body size and reproductive condition of a paper wasp, *Polistes metricus* (Hymenoptera: Vespidae). *The Canadian Entomologist* 112: 239-248.

Hagiwara Y and Kojima J (2002). Reproductive options for first brood “workers” emerging in orphan nests of *Polistes nipponensis* (Hymenoptera, Vespidae). *Insectes Sociaux* 49:191–195

Hartfelder K (2000). Insect juvenile hormone: from “status quo” to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33:157-177.

Hunt JH (1991). Nourishment and the evolution of the social Vespidae. In Ross, KG and Matthews RW. (editores). *The social biology of wasps*. pp. 426-450. Ithaca NY: Cornell University Press. 678pp.

Hunt JH, Schmidt DK, Mulkey SS, and Williams M A (1996). Caste dimorphism in the wasp *Epipona guerini* (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae, Epiponini): Further evidence for larval determination. *Journal of the Kansas Entomological Society*. 69:

362-369.

Ishay J (1975). Caste Determination by Social Wasps: Cell Size and Building Behaviour. *Animal Behaviour* 23: 429- 431.

Jeanne RL (1972). Social biology of the neotropical wasp *Mischocyttarus drewseni*. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 144: 63-150.

Jeanne RL (1996). Non-allometric queen-worker dimorphism in *Pseudopolybia difficilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, suppl., 69: 370-374.

Kaib M, Jmhasly P, Wilfert L, Durka W, Franke S, Francke W, Leuthold RH and Brandl R (2004). Cuticular hydrocarbons and aggression in the termite *Macrotermes subhyalinus*. *Journal Chemical Ecology*. 30: 365-385.

Keeping MG (2002). Reproductive and worker castes in the primitively eusocial wasp *Belonogaster petiolata* (DeGeer) (Hymenoptera: Vespidae): evidence for pre-imaginal differentiation. *Journal of Insect Physiology*. 48: 867-879.

Lengyel F, Westerlund SA and Kaib M (2007). Juvenile hormone III influences task specific cuticular hydrocarbon profile changes in the ant *Myrmicaria eumenoides*. *Journal of Chemical Ecology*. 33: 167-181.

Liang D and Silverman J (2000). ‘You are what you eat’: Diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften*. 87: 412-416.

Mead F and Gabouriaut D (1993). Post-eclosion sensitivity to social context in *Polistes dominulus* Christ females (Hymenoptera, Vespidae). *Insectes Sociaux* 40: 11-20.

Monnin T (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Annales Zoologici Fennici*. 43: 515-530.

Montagna TS, Raizer J, Antonialli-Junior WF (2015). Effect of Larval Topical Application of Juvenile Hormone on Caste Determination in the Independent-Founding Eusocial Wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Open Journal of Animal Sciences* 5: 174-184.

Murakami ASN and Shima SN (2006). Nutritional and social hierarchy establishment of the primitively eusocial wasp *Mischocyttarus cassununga* (Hymenoptera, Vespidae, Mischocyttarini) and related aspects. *Sociobiology* 48: 183-207.

Neves EF, Andrade LHC, Suárez YR, Lima SM and Antonialli-Junior WF (2012). Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus*

- consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). Genetics and Molecular Research, 11 (3): 1891-1898.
- Nielsen J, Boomsma JJ, Oldham NJ, Petersen HC and Morgan ED (1999). Colony level and seasonspecific variation in cuticular hydrocarbon profiles of individual workers in the ant *Formica truncoru*. Insectes Sociaux. 46: 58-65.
- O' Donnell S (1998). Reproductive caste determination in eusocial wasps (Hymenoptera: Vespidae). Annual Reviews of Entomology 43: 323-446.
- Pardi L and Marino-Piccioli MT (1981). Studies on the biology of *Belonogaster* (Hymenoptera Vespidae). 4. On caste differences in *Belonogaster griseus* (Fab.) and the position of this genus among social wasps. Monitore zoologico italiano (Nuova serie) 14: 131-146.
- Rembold H (1964). Die kastenentstehung bei der honigbiene, *Apis mellifica* L. Naturwissenschaften. 51: 49-54.
- Rembold H (1987). Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. Insect Biochemistry. 17: 1003-1006.
- Rembold H, Czoppelt CH, Grune M, Lacner B, Pfeffer J and Woker E (1992). Juvenile hormone titers during honey been embryogenesis and metamorphosis. 37-43. In: Insect Juvenile Hormone Research' (Mauchamp, B., Couillaud, F., Baehr, J. C. eds.
- Robinson GE and Vargo EL (1997). Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. Archives of Insect Biochemistry an Physiology 35: 559-583.
- Roseler PF (1977). Endocrine control of polymorphism in bumblebees. 22-23 in International Union for the Study of Social Insects.
- Rossi AM and Hunt JH (1988). Honey supplementation and its developmental consequences: evidence for food limitation in a paper wasp, *Polistes metricus*. Ecological Entomology 13: 437-442.
- Singer TL, Espelie KE. and Gamboa GJ. Nest and nestmate discrimination in independent-founding wasps. In: Vander Meer, R.K., Breed, M.D., Winston, M.L., Espelie, E.K. 1998. (eds.), Pheromone communication in social.insects, Westview, Boulder. 104-125.
- Sledge MF, Boscaro F and Turillazzi S (2001). Cuticular hydrocarbons and reproductive status in the social wasp *Polistes dominulus*. Behavior Ecology Sociobiology. 49: 401-409.

Sledge MF, Trinca I, Massolo A, Boscaro F. and Turillazzi S (2004). Variation in cuticular hydrocarbon signatures, hormonal correlates and establishment of reproductive dominance in a polistine wasp. *Journal of Insect Physiology* 50: 73-83.

Solís CR and Strassmann, JE (1990). Presence of brood affects caste differentiation in the social wasp, *Polistes exclamans* Viereck (Hymenoptera: Vespidae). *Functional Ecology* 4: 531-541.

Tobe SS and Stay B (1985). Structure and regulation of the corpus allatum. *Advances in Insect Physiology*. 18: 305-432.

Turillazzi, S. 1980. Seasonal variations in the size and anatomy of *Polistes gallicus* (L.) (Hymenoptera: Vespidae). *Monitore Zoologico Italiano - Italian Journal of Zoology* 14: 63-75.

Vander Meer RK and Morel L (1998). Nestmate recognition in ants. In R. K. Vander Meer, M. Breed, Winston M and Espelie KE. [eds.], *Pheromone communication in social insects*. Westview Press, Boulder, CO. 368: 79-103.

Weaver N (1974). Control of dimorphism in the female honeybee. 2. Methods of rearing larvae in the laboratory and preserving royal jelly. *Journal of Apicultural Research*. 13: 3-14.

Wenzel JW (1992). Extreme queen-worker dimorphism in *Ropalidia ignobilis*, a small colony wasp (Hymenoptera: Vespidae). *Insectes Sociaux* 39: 31-43.

West-Eberhard MJ (1978). Temporary queens in *Metapolybia* wasps: non-reproductive helpers without altruism? *Science* 200: 441-443.

West-Eberhard MJ (1981). Intragroup selection and the evolution of insect societies. In: Alexander R. D., Tinkle, D. W. (eds.). *Natural selection and social behavior*. Chiron Press, New York 3-17.

Wheeler DE (1986). Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. *The American Naturalist* 128: 13-34.

Wilson EO (1971). *The insect societies*. Cambridge, Belknap Press. 548pp.

Revisão de Literatura

1. Revisão de Literatura

1.1. Hidrocarbonetos cuticulares funcionam como “digital” química para insetos sociais.

A sociedade dos insetos pode ser composta por milhares de indivíduos que para manter sua organização precisa de um sistema de comunicação eficiente que é realizada por meio de sinais acústicos, visuais, táteis, magnéticos e principalmente, químicos (Billen 2006).

A comunicação química, sobretudo, é fundamental para o bom funcionamento das sociedades dos insetos sociais (Monnin 2006) e, entre os compostos utilizados como mediadores de diferentes comportamentos podemos destacar os feromônios que estão divididos em duas classes, os leves e os superficiais, que tem sua origem em glândulas e os de cadeias de hidrocarbonetos presentes na cutícula (Howard 1993).

Esses hidrocarbonetos cuticulares (HCs) são conhecidos por “feromônios de superfície” da classe dos superficiais, que são detectados a distâncias relativamente pequenas (Abdalla et al., 2003) e são utilizados pelos insetos sociais como mediadores de diferentes comportamentos e status fisiológico. Eles sinalizam diferentes condições biológicas nas colônias, como por exemplo, a idade, a casta, o sexo e até mesmo o potencial reprodutivo de um indivíduo (Liang e Silverman 2000, Antonialli-Junior et al., 2007; Neves et al., 2012; Bernardi et al., 2014; Torres et al., 2014).

Nos últimos anos esses feromônios vêm sendo foco de muitos estudos com o objetivo de se entender como ocorre a transferência/recebimento desses sinais químicos e sua importância na vida dos insetos sociais (revisto em Howard e Blomquist 2005). Sabe-se que tais compostos formam um perfil químico característico que é utilizado no reconhecimento entre companheiros de ninho (Blomquist 2010).

Entretanto, evolutivamente, a função primária dos HCs é evitar a perda de água nos insetos e formar uma barreira contra microrganismos invasores (Howard e Blomquist 2005). Estes compostos são formados por uma mistura de alcanos lineares e ramificados, alcenos e alcadienos, que diferem tanto qualitativa quanto quantitativamente entre espécies (Gibbs 2002). Os alcanos formam uma camada impermeabilizante que envolve o corpo dos insetos protegendo-os contra a dessecação, enquanto que os alcenos e alcanos ramificados especula-se que sejam os principais compostos utilizados na troca de sinais durante a comunicação química (Gibbs 2002). Neste sentido, Wagner et al., (2001) avaliaram que as operárias da formiga *Pogonomyrmex barbatus*, que permaneciam mais tempo fora do ninho tiveram a

proporção de alcanos aumentadas em relação as operárias que executaram trabalhos intranidais.

Dani et al., (2001) manipulando colônias de *Polistes dominula* perceberam que fêmeas que receberam aplicação de alcanos lineares sintéticos tiveram seu perfil químico alterado, mas não foi encontrada nenhuma alteração quanto a aceitação de suas companheiras de ninho, enquanto que as operárias que receberam aplicação de alcanos ramificados ou com alcenos foram recebidos de forma agressiva pelas companheiras, sugerindo que os alcanos lineares ao contrário dos ramificados e alcenos, não sejam tão relevantes para sinalização química.

No entanto, alguns trabalhos têm mostrado que, os alcanos lineares, ao contrário, também podem possuir um papel importante na comunicação química, como por exemplo, Lorenzi et al., (2004) trataram vespas *Polistes dominula* recém emergidas e mais velhas com alcanos lineares e perceberam que as vespas recém-emergidas foram tratadas de forma agressiva pelas companheiras, enquanto que as vespas mais velhas não absorveram esses compostos e foram tratadas de forma mais amigável, o que sugere que os alcanos lineares foram utilizados no reconhecimento dessas companheiras de ninho.

Kather et al., (2011) avaliaram em colônias de *Apis Mellifera* se a quantidade ou concentração de compostos cuticulares poderiam se alterar de acordo com a tarefa e perceberam que a proporção de alcanos lineares e alcenos são maiores em forrageadoras, seguido das enfermeiras e recém emergidas. Entretanto, 40% das forrageadoras não apresentaram alcenos em sua composição cuticular, enquanto as enfermeiras apresentaram esses compostos em abundância, o que levanta suspeita de que os alcanos lineares possam ser utilizados para distinguir as tarefas executadas pelos insetos sociais, além de sua função primária.

Outra possível função dos alcanos lineares é relatada no trabalho de Ferreira et al., (2012) em que os autores conseguiram distinguir 3 espécies do gênero *Mischocyttarus* e um caso de parasitismo facultativo neste mesmo gênero em que foi possível perceber que o parasita consegue misturar sua assinatura química com a do hospedeiro, modificando não só a sua mas a assinatura do hospedeiro para passar despercebido.

Já em relação aos alcanos ramificados, é relatado que além do processo de reconhecimento, estes sejam também utilizados como sinalizadores do status fisiológico, como relatado por Weil et al., (2009) com o térmita *Cryptotermes secundus*, em que o aumento da abundância de alcanos metil-ramificados de cadeia longa seria um indicativo de fertilidade entre seus membros. O mesmo ocorrendo com a vespa *Dolichovespula saxônica* e com a formiga *Lasius* em que alguns alcanos ramificados são encontrados apenas em rainhas das espécies (van Zweden et al., 2013; Holman et al., 2013).

De fato todos os hidrocarbonetos cuticulares em um contexto mais geral sinalizam vários processos da vida dos insetos sociais, formando o perfil químico colonial único e dinâmico, que pode variar de acordo com diferentes fatores como, por exemplo, os ambientais, encontrados nos trabalhos de Buczkowski et al., (2005) com a formiga *Linepithema humile* e Bernardi et al., (2014) com *Ectatomma brunneum* em que observaram que quando colônias de mesma espécie são submetidas as mesmas dietas o perfil químico cuticular acaba se homogeneizando e consequentemente diminuindo a agressividade entre elas.

Outro fator responsável pela diferenciação do perfil químico cuticular é em relação as castas rainhas e operárias e ao sexo, que formam um perfil característico como visto no trabalho de Abdalla et al., (2003) com a abelha *Melipona bicolor*, Antonilli-Junior et al., (2007) com *Ectatomma vizottoi* e Nunes et al., (2009) na abelha *Schwarziana quadripunctata*.

Essas mudanças na assinatura química dos insetos também são capazes de sinalizar a idade de cada membro dentro de uma colônia, por exemplo, em *Polistes dominula* as vespas mais velhas apresentam maior quantidade de hidrocarbonetos cuticulares metil ramificados do que vespas recém-emergidas (Lorenzi et al., 2004). E em *Melipona marginata* (Ferreira-Caliman et al., 2010) os hidrocarbonetos cuticulares sinalizam as idades e as castas de suas operárias.

Já nos trabalhos de Panek et al., (2001) e Neves et al., (2012) com *Polistes fuscatus* e *Mischocyttarus consimilis*, respectivamente, os autores observaram que fêmeas recém emergidas dessas espécies não possuem um perfil químico definido, mas que de 3 a 5 dias este perfil parece adquirir uma “estabilidade”.

Além da idade os hidrocarbonetos cuticulares são capazes de sinalizar ou estimular a execução de tarefas de um indivíduo em sua colônia, como por exemplo, os hidrocarbonetos deixados na entrada do ninho por formigas patrulheiras, estimula a atividade de forrageio de outras operárias da espécie *Pogonomyrmex barbatus* (Greene e Gordon 2003). Ou ainda no trabalho de Dapporto et al., (2005) em que operárias de *Polistes dominula* que perderam a rainha de suas colônias passaram a ter o perfil químico cuticular característico de uma fêmea dominante.

Já a formiga *Camponotus floridanus* as operárias de colônias que perderam suas rainhas não se reproduziram mesmo na sua ausência, porque os ovos que restaram possuíam em sua superfície hidrocarbonetos que sinalizavam sua presença (Endler et al., 2004). Em cupins do gênero *Zootermopsis* a tolerância entre indivíduos de colônias diferentes é mediada pela variação dos seus perfis químicos cuticulares e quando se encontram e não reconhecem o perfil químico um do outro, liberam feromônio de alarme (Haverty e Thorne, 1989). Portanto, esses trabalhos sugerem que o contexto social desses indivíduos é um fator importante na dinâmica dos hidrocarbonetos cuticulares (Dapporto et al., 2005).

1.2. Hormônio Juvenil e seu papel no comportamento e status reprodutivos dos insetos sociais

Os insetos produzem três tipos de hormônios importantes no crescimento e reprodução, os ecdissteróides que atuam na atividade de muda e podem estar relacionados também a maturação dos ovários (como a disposição do vitelo); os neuro-hormônios que são proteínas mensageiras que regulam vários aspectos do desenvolvimento, homeostase e reprodução dos insetos e por último os HJ que são moléculas sinalizadoras que atuam na metamorfose e regulação do desenvolvimento reprodutivo (Gullan e Craston, 2012).

Dentre eles, o HJ tem sua origem no *corpora allata*, um par de corpos glandulares pequenos, originados do epitélio e localizados em ambos os lados do trato digestório anterior, e em alguns insetos fundem-se para formar uma glândula única (Gullan e Craston, 2012). Este hormônio tem função reguladora tanto na metamorfose quanto na reprodução, ativando o funcionamento dos ovários, glândulas acessórias e o corpo gorduroso (Gullan e Craston 2012).

A taxa de HJ está intimamente ligada ao status reprodutivo dos insetos, sendo que nas fêmeas ele age estimulando o corpo gorduroso a produzir vitelogenina, que é

absorvida pelo ovário. Já nos machos, estimula a síntese de proteínas pelas glândulas acessórias (Hartfelder 2000).

Neste contexto, as fêmeas dominantes do gênero *Polistes* apresentam uma taxa elevada de HJ em sua hemolinfa, enquanto que as subordinadas apresentam uma baixa atividade do *corpora allata* (Strambi, 1990). Giray et al., (2005) avaliaram que em fêmeas de *Polistes canadensis* o título de HJ esta, de fato, ligado a fisiologia do ovário das fundadoras, que possuem uma elevada taxa em sua hemolinfa e, por consequência um maior desenvolvimento ovariano quando comparado ao das operárias.

Já Tibbetts e Zachary (2010) observaram colônias de *Polistes dominula*, que ao removerem a rainha, houve um aumento nas taxas de HJ na hemolinfa das operárias ocasionando maior frequência de comportamentos agressivos durante o período de competição por uma substituta. Já as operárias de colônias em que as rainhas não foram removidas, apresentaram os níveis de HJ permaneceram relativamente baixos e houve menor agressividade, demonstrando que o contexto social está diretamente ligado as taxas de HJ.

Outra importante ação do HJ, além de mediar as interações sociais é modular a ontogenia comportamental de colônias destes insetos (Giray et al., 2005). O polietismo temporal é regida pelas taxas de HJ, como por exemplo, em *Polybia occidentalis*, na qual a taxa de HJ induz as operárias a mudar seu repertório comportamental de atividades intranidais para extra-nidais precocemente (O'Donnell e Jeanne 1993). O mesmo pode ser visto em espécies de abelhas “altamente” sociais, nas quais as taxas de HJ na hemolinfa de operárias, aumenta gradativamente à medida que envelhecem e, por consequência, vão alterando as frequências com que executam tarefas intranidais em detrimento das extranidais (Robinson et al., 1992). Neste contexto, quando é feita a aplicação de HJ exógeno em operárias jovens elas passam a forragear precocemente (Robinson 1985; 1987; Robinson e Vargo 1997).

Em formigas da espécie *Pogonomyrmex californicus* as rainhas podem fundar seus ninhos solitariamente ou com ajuda de co fundadoras, essas rainhas que forrageiam durante o processo de fundação de suas colônias, apresentam maiores taxas de HJ do que as que não forrageiam (Dolezal et al., 2009).

Em vespas do gênero *Polistes* com a manipulação de colônias pela aplicação de HJ leva às fêmeas com maior desenvolvimento dos ovários e, por consequência elas alteram seu comportamento passando a serem mais agressivas e dominantes quanto à postura de ovos em relação aquelas fêmeas que não receberam aplicação de HJ (Röseler et al., 1984; Giray et al., 2005).

Em cupins as taxas de HJ também modulam as funções entre as castas, uma vez que operários com taxas de HJ mais baixos permanecem como operários, mesmo depois de sofrer muda, enquanto que operários com taxas mais altas conseguem se diferenciar em pré-soldados ou soldados como já descrito em colônias de *Coptotermes formosanus* (Park e Raina 2003).

1.3. Hormônio Juvenil e sua relação com determinação de castas e assinatura química cuticular em insetos sociais

O desenvolvimento de castas férteis e estéreis em insetos sociais são regulados por fatores endócrinos, e o Hormônio juvenil (JH) é o principal elemento da divisão reprodutiva de trabalho nos himenópteros sociais (Lengyel et al., 2007). Contudo, em insetos altamente sociais as diferenças morfológicas entre as castas reprodutivas e estéreis são definidas pela alimentação diferencial na fase larval (Wheeler 1986; Hunt, 1991; 1994; Karsai e Hunt 2002).

Em *Apis mellifera*, por exemplo, as larvas que originarão rainhas se alimentam exclusivamente de geléia real durante todo o desenvolvimento larval, o que mantém os níveis elevados de HJ, enquanto que as operárias após o 2^o ou o 3^o instar larval passam a ser alimentadas com uma mistura de mel, pólen e geléia real, o que provoca a queda dos níveis de HJ e causa a degeneração dos ovários (Beetsma 1979; Rembold et al., 1992; Santos e Cruz Landim 2002).

Alguns autores sugerem que as diferenças entre rainhas e operárias em Vespinae ocorre por meio da diferenciação alimentar das larvas sendo que larvas que originarão operárias sofrem uma castração nutricional originando adultos com menor taxa de HJ em sua hemolinfa e conseqüentemente a um menor desenvolvimento ovariano (Marchal 1896, 1897 apud Wilson 1971, Hunt 1994).

Já em vespas de fundação independente, em que a diferenciação morfológica não é aparente, acreditava-se que a determinação de castas ocorria apenas por meio de interações de dominância (Röseler 1991; Bourke 1988; Heinze et al., 1994; Monnin e Peeters 1998 e 1999). Porém alguns trabalhos sugerem que possa ocorrer determinação pré-imaginal, o trabalho de Rossi e Hunt (1988) demonstra que a alimentação na fase larval de melhor qualidade em *Polistes metricus*, originou adultos maiores, com maiores taxas de HJ em sua hemolinfa e com maior desenvolvimento ovariano. Em larvas de *Bombus terrestris*, um aumento no consumo de alimento eleva as taxas de HJ e origina rainhas (Ribeiro et al., 1999; Cnaani et al., 1997).

A ação do HJ já foi documentada em vários trabalhos ser instar dependente (Wirtz 1973; Rembold et al., 1974; Rembold et al., 1992), ou seja, a elevação de sua concentração em determinados períodos de desenvolvimento larval, leva a diferenças significativas.

O que pode ser observado no estudo de Antonialli-Junior e Cruz-Landim (2009) com operárias *Apis mellifera* foi analisado o efeito da aplicação do HJ nos 2^o, 3^o, 4^o e 5^o dias de vida larval e constatou-se que o período sensível à ação do hormônio foi no 3^o instar larval, no qual larvas de operárias com 6 dias de vida possuíam a área dos ovários mais desenvolvida, e segundo os autores o hormônio atua protegendo e/ou prevenindo a degeneração nos ovários das larvas de operárias.

Já no trabalho de Penick et al., (2012) os autores estudaram o período sensível para a determinação de casta na formiga *Harpegnathos saltator*, onde aplicaram um Hormônio Juvenil em larvas nos 4 instares larvais e perceberam que quando aplicaram no 3^o e no 4^o instar induziam a produção de rainhas. Os autores sugeriram ainda que a determinação de castas nesta espécie surgiu originalmente no final da fase larval em uma condição ancestral, e com o tempo começaram a adquirir características avançadas, o que pode ter facilitado o desenvolvimento maior do dimorfismo entre rainhas e operárias, bem como as diferenciações entre as castas de operárias.

Mais recentemente no trabalho de Montagna et al., (2015) foi possível constatar que a aplicação de HJ no 3^o instar larval origina fêmeas com potencial de gines em *Mischocyttarus consimilis*.

Portanto existe um período sensível para determinação de castas, e este período varia entre as espécies (Panick et al., 2012), por exemplo, no estudo de de Rajakumar et al., (2012) a aplicação de hormônio Juvenil em larvas de operárias de *Pheidole rhea* originou super soldados. Resultado similar pode ser visto com *Reticulitermes flavipes* em que o tratamento com HJ III em operários também levou a formação de soldados (Tarver et al., 2009).

Em *Polybia occidentalis* a aplicação do HJ acelerou o polietismo temporal e diminuiu a longevidade de operárias. Já em *Polistes canadensis* a aplicação de HJ em recém-emergidos provocou a antecipação do comportamento de guarda (Giray et al., 2005).

Entretanto o Hormônio Juvenil (HJ) além de estar diretamente relacionado a determinação de castas em insetos sociais, também está associado a modificações da assinatura química cuticular (Sledge et al., 2004). Contudo são poucos os trabalhos que avaliaram os efeitos do HJ no perfil químico cuticular de insetos sociais (Lengyel et al.,

2007). Como por exemplo, operárias forrageadoras de *Myrmicaria eumenoides* apresentam maiores taxas de HJ do que as que nutridoras, contudo, quando é aplicado HJ nestas ultimas ocorre uma mudança do perfil de hidrocarbonetos cuticulares semelhantes ao das operárias que forrageiam (Lengyel et al., 2007).

Em abelhas os feromônios da rainha são detectados pelas operárias, e em resposta há a redução da taxa de HJ em sua hemolinfa fazendo com que permaneçam estéreis (Kaatz et al., 1992; Wanner et al., 2007).

Em cupins da espécie *Cryptotermes secundus* os reprodutores apresentam elevada taxa de HJ que reflete em um perfil químico cuticular diferente dos outros membros da colônia (Weil et al., 2009).

Izzo et al., (2010) discutem que as taxas de HJ medeiam o status reprodutivo que é sinalizado pelos HCs em fêmeas de *Polistes dominula*. O mesmo sendo encontrado por Sledge et al., (2004) com a mesma espécie, cujo estudo investigou e encontrou uma correlação significativa entre status reprodutivo, tamanho do *corpora allata*, e as proporções de hidrocarbonetos cuticulares.

Portanto compreender como o HJ age modulando a assinatura química dos insetos é um grande passo para se entender aspectos importantes que moldam a sociabilidade dos insetos, como por exemplo, a utilização desses sinais para o reconhecimento de companheiros de ninhos, de castas, idade e até mesmo informações sobre o status fisiológico (Gamboa et al., 1996; Singer et al., 1998; Antonialli-Junior et al., 2007; Wanner et al., 2007; Neves et al., 2012;).

2. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da aplicação tópica de HJ em larvas e adultos recém emergidos sobre compostos químicos cuticulares, comportamento, fisiologia do ovário e sinais visuais de fêmeas adultas de *Mischocyttarus consimilis*.

3. Referências Bibliográficas

Abdalla FC, Jones GR, Morgan ED and Cruz-Landim C (2003). Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. Genetics and Molecular Research 2: 191-199.

Antonialli-Junior WF, Lima SM, Andrade LHC and Suarez YR (2007). Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. Genetics and Molecular Research 6: 492-499.

Antonialli-Junior WF, and Cruz-Landim C (2009). Efeitos da aplicação tópica de hormônio juvenil sobre o desenvolvimento dos ovários de larvas de operárias de *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera, Apidae). Revista Brasileira de entomologia. 53: (1) 115-120.

Beetsma J (1979). The process of queen-worker differentiation in the honey bee. Bee World. 60: 24-39.

Bernardi RC, Firmino ELB, Pereira MC, Andrade LHC, Cardoso CAL, Suárez YR, Antonialli-Junior WF and Lima SM (2014). Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy as a potential tool in assessing the role of diet in cuticular chemical composition of *Ectatomma brunneum*. Genetics and Molecular Research. 13 (4): 10035-10048.

Billen J (2006). Signal variety and communication in social insects. Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology. 17: 9-25.

Blomquist G (2010). Structure and analysis of insect hydrocarbons. In Bonquist GJ and Bagnères AG. (Eds). Insect Hydrocarbons. Cambridge University Press. Cambridge. 19- 34.

Bourke AFG (1988). Dominance orders, worker reproduction, and queen-worker conflict in the slave-making ant *Harpagoxenus sublaevis*. Behavioral Ecology and Sociobiology 23: 323-333.

Buczkowski G and Silverman J (2005). Context-dependent nestmate discrimination and the effect of action thresholds on exogenous cue recognition in the Argentine ant. Animal Behaviour. 69: 741-749.

Cnaani J, Borst DW, Huang ZY and Robinson GE (1997). Caste determination in *Bombus terrestris*: differences in development and rates of JH biosynthesis between queen and worker larvae. *Journal of Insect Physiology*. 43: 373-381.

Dani FR, Jones GR, Destri S, Spencer SH and Turillazzi S (2001). Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. *Animal Behaviour*. 62: 165-171.

Dapporto L, Sledge MF and Turillazzi S (2005). Dynamics of cuticular chemical profiles of *Polistes dominulus* workers in orphaned nests. *Journal of Insect Physiology*. 51: 969-973.

Dolezal GA, Brent CS, Gadau J, Hölldobler B and Amdam GV (2009). Endocrine physiology of the division of labour in *Pogonomyrmex californicus* founding queens. *Animal Behaviour*. 77: 1005-1010.

Endler A, Liebig J, Schmitt T, Parker JE, Jones GR, Schreier P and Hölldobler B (2004). Surface hydrocarbons of queen eggs regulate worker reproduction in a social insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 2945-2950.

Ferreira AC, Cardoso CAL, Neves EF, Suárez, YR and Antonialli-Junior WF (2012). Distinct linear hydrocarbon profiles and chemical strategy of facultative parasitism among *Mischocyttarus* wasps. *Genetics and Molecular Research* 11: 4351-4359.

Ferreira-Caliman MJ, Nascimento FS, Turatti ICC, Mateus S, Lopes NP and Zucchi R (2010). The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. *Journal of Insect Physiology*. 56: 800-804.

Gamboa GJ, Grudzier AT, Espelie AK and Bura AE (1996). Kin recognition in social wasps: combining behavioral and chemical evidence. *Animal Behaviour* 51:625-629.

Gibbs AG (2002). Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *Journal of Insect Physiology*. 48: 391-400.

Giray T, Giovanetti M and West-Eberhard MJ (2005). Juvenile hormone, reproduction, and worker behavior in the neotropical social wasp *Polistes canadensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* .102: 3330-3335.

Greene MJ and Gordon DM (2003). Social insects: Cuticular hydrocarbons inform task decisions. *Nature* 423: 32.

- Gullan PJ and Cranston PS (2012). Os insetos: um resumo de entomologia. 4ed. São Paulo: Roca. 480p.
- Hartfelder K (2000). Insect juvenile hormone: from “status quo” to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 33: 157-177.
- Haverty MI and Thorne BL (1989). Agonistic behavior correlated with hydrocarbon phenotypes in dampwood termites, *Zootermopsis* (Isoptera: Termopsidae). *Journal of Insect Behavior*. 2: 523-543.
- Heinze J, Hölldobler B and Peeters C (1994). Conflict and cooperation in ant societies. *Naturwissenschaften*, Halle. 81: 489-497.
- Holman L, Lanfear R and d’Ettorre P (2013). The evolution of queen pheromones in the ant genus *Lasius*. *Journal of Evolutionary Biology*. 26: 1549-1558.
- Howard RW (1993). Cuticular hydrocarbon and chemical communication. In: *Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology* (Stanley-Samuelson, D. W., Nelson D. R., eds.). University of Nebraska Press, Lincoln. 179-226.
- Howard RW, Blomquist GJ (2005). Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Reviews of Entomology*. 50: 371-393
- Hunt JH (1991). Nourishment and the evolution of the social Vespidae. In Ross KG and Matthews RW. (editores). *The social biology of wasps*. pp. 426-450. Ithaca, NY: Cornell University Press. 678pp.
- Hunt JH and Nalepa CA (1994). Nourishment, evolution and insect sociality. Pp. 1-19 in Hunt JH. and Nalepa CA, eds., *Nourishment and Evolution in Insect Societies*. Westview Press, Boulder, CO, and Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India.
- Izzo A, Wells M, Huang Z and Tibbetts E (2010). Cuticular hydrocarbons correlate with fertility, not dominance, in a paper wasp, *Polistes dominulus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 64 (5): 857-864.
- Kaatz HH, Hildebrandt H, and Engels W (1992). Primer effect of queen pheromone on juvenile hormone biosynthesis in adult worker honey bees. *Journal of Comparative Physiology B. Biochemical, Systems, and Environmental Physiology*. 162: 588 -592.
- Karsai I, and Hunt JH (2002). Food quantity affects traits of offspring in the paper wasp *Polistes metricus* (Hymenoptera: Vespidae). *Environmental Entomology* 31: 99-106.

Kather R, Drijfhout FP and Martin SJ (2011). Task group differences in cuticular lipids in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Chemical Ecology*. 37: 205-212.

Lengyel F, Westerlund SA and Kaib M (2007). Juvenile hormone III influences task-specific cuticular hydrocarbon profile changes in the ant *Myrmicaria eumenoides*. *Journal of Chemical Ecology*. 33: 167-181.

Liang D and Silverman J (2000). “You are what you eat”: diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften*. 87: 412-416

Lorenzi MC, Sledge MF, Laiolo P, Sturlini E and Turillazzi S (2004) Cuticular hydrocarbon dynamics in young adult *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) and the role of linear hydrocarbons in nestmate recognition systems. *Journal of Insect Physiology* 50: 935-941.

Marchal P (1896). La reproduction et evolution des guepes social. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, Paris, v. 4, p. 1-100. In: Wilson, E. O. *The insect societies*. Cambridge, Belknap Press of Harvard University Press, 1971. 548 p.

Marchal P (1897). La castration nutriciale chez les Hyménoptères sociaux. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, p. 556-557. In: Wilson, E. O. *The insect societies*. Cambridge, Belknap Press of Harvard Univ. Press, 1971. 548 p.

Monnin T (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects - *Annales Zoologici Fennici*. 43: 515- 530.

Monnin T and Peeters C (1998). Monogyny and regulation of worker mating in the queenless ant *Dinoponera quadricaps*. *Animal Behaviour*, Londres. 55; 299-306.

Monnin T and Peeters C (1999). Dominance hierarchy and reproductive conflicts among subordinates in a monogynous queenless ant. *Behavioral Ecology*. 10: (3) 323-332.

Montagna TS, Raizer J, Antonialli-Junior WF (2015). Effect of Larval Topical Application of Juvenile Hormone on Caste Determination in the Independent-Founding Eusocial Wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Open Journal of Animal Sciences*. 5: 174-184.

Neves EF, Andrade LHC, Suárez YR, Lima SM, Antonialli-Junior WF (2012). Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genetics and Molecular Research*, 11 (3): 1891-1898.

Nunes TM, Turatti IC, Mateus S, Nascimento FS, Lopes NP and Zucchi R (2009). Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata*

- (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age. *Genetics and Molecular Research*. 8: 589–595.
- O'Donnel S, Jeanne RL (1993). Methoprene accelerates age polyethism in workers of social wasp. *Physiological Entomology*. 18: 189-194.
- Panek LM, Gamboa GJ, Espelie KE (2001). The effect of a wasp's age on its cuticular hydrocarbon profile and its tolerance by nestmate and non-nestmate conspecifics (*Polistes fuscatus*, Hymenoptera: Vespidae). *Ethology* 107: 55-63.
- Park YI and Raina A (2003). Factors regulating caste differentiation in the *Formosan subterranean* termite with emphasis on soldier formation. *Sociobiology*. 41: 1–12.
- Penick CA, Prager SS and Liebig J (2012). Juvenile Hormone Induces Queen Development in Late-Stage Larvae of the Ant *Harpegnathos saltator*. *Journal of Insect Physiology*. 58: 1643-1649.
- Rajakumar R, San Mauro D, Dijkstra MB, Huang MH, Wheeler DE, Hiou-Tim F, Khila A, Cournoyea M and Abouheif E (2012). Ancestral developmental potential facilitates parallel evolution in ants. *Science*. 335: 79-82
- Rembold H and Czoppelt CH, Rao PJ (1974). Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* 20: 1193-1202.
- Rembold H, Czoppelt CH, Grune M, Lacner B, Pfeffer J and Woker E (1992). Juvenile hormone titers during honey bee embryogenesis and metamorphosis, p. 37–43. *In: Insect Juvenile Hormone Research* (B. Mauchamp, F. Couillaud, and J. C. Baehr, eds.).
- Ribeiro MF, Duchateau MJ and Velthuis HHW (1999). Feeding frequency and caste differentiation in *Bombus terrestris* larvae. *Insectes Sociaux* 46: 306-314.
- Robinson GE (1985). Effects of a juvenile hormone analogue on honey bee foraging behaviour and alarm pheromone production. *Journal of Insect Physiology* 31: 277-282.
- Robinson GE, Strambi C, Strambi A and Huang, ZY (1992). Reproduction in worker honey bees is associated with low juvenile hormone titers and rates of biosynthesis. *General and Comparative Endocrinology*. 87: 471-480.
- Robinson GE and Vargo EL (1997). Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 35: 559-583.

Röseler PF, Röseler I, Strambi A and Augier R (1984). Influence of insect hormones on the establishment of dominance hierarchies among foundresses of the paper wasp, *Polistes gallicus*. Behavioral Ecology and Sociobiology. 15: 133-142.

Röseler PF (1991). Reproductive competition during colony establishment. In Ross, K.G., Matthews, R.W editors. The social biology of wasps. Ithaca, NY: Cornell University Press. 309-335.

Rossi AM and Hunt JH (1988). Honey supplementation and its developmental consequences: evidence for food limitation in a paper wasp, *Polistes metricus*. Ecological Entomology. 13: 437- 442.

Santos TCA and Cruz-Landim C (2002). Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): diferenciação do ovário. Revista Brasileira de Zoolologia. 19 (3): 703-704.

Singer TL, Espelie KE and Gamboa GJ (1998). Nest and nestmate discrimination in independent-founding wasps. In: Vander Meer, R.K., Breed, M.D., Winston, M.L., Espelie, E.K., editors. Pheromone communication in social insects 104-125. Boulder, Westview Press.

Sledge MF, Trinca I, Massolo A, Boscaro F and Turillazzi S (2004). Variation in cuticular hydrocarbon signatures, hormonal correlates and establishment of reproductive dominance in a polistine wasp Journal of Insect Physiology. 50: 73-83.

societies. Naturwissenschaften, Halle. 81: 489-497.

Strambi A (1990). Physiology and reproduction in social wasps. In: Engels W (Editor), Social Insects - an Evolutionary Approach to Castes and Reproduction. Springer, Berlin, 59-75.

Tarver MR, Schmelz EA, Rocca JR and Scharf ME (2009). Effects of soldier-derived terpenes on soldier caste differentiation in the termite *Reticulitermes flavipes*. Journal of Chemical Entomology. 35: 256–264

Tibbetts A and Zachary YA (2010). The challenge hypothesis in an insect: juvenile hormone increases during reproductive conflict following queen loss in *Polistes* wasps, The American Naturalist. 76: 123-130.

Torres VO, Sguarizi-Antonio D, Lima SM, Andrade LHC and Antoniaali-Junior WS (2014). Reproductive Status of the social wasp *Polistes versicolor* (Hymenoptera, Vespidae). Sociobiology 61(2): 218-224.

Van Zweden JS, Bonckaert W, Wenseleers T and d'Ettorre P (2013). Queen signaling in social wasps. Evolution. 68: 976-986.

Wagner D, Tissot M and Gordon D (2001). Task-related environment alters the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants. *Journal of Chemical Ecology*. 27: 1805-1819.

Wanner KW, Nichols AS, Walden KKO, Brockmann A, Luetje CW and Robertson HM (2007). A honey bee odorant receptor for the queen substance 9-oxo 2-decenoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 14 383-14 388.

Weil T, Hoffmann K, Kroiss J, Strohm E and Korb J (2009). Scent of a queen-cuticular hydrocarbons specific for female reproductives in lower termites. *Naturwissenschaften* 96: 315–319.

Wheeler DE (1986). Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. *The American Naturalist*. 128: 13-34.

Wirtz P (1973). Differentiation in the honeybee larva. A histological, electron microscopical and physiological study of caste induction in *Apis mellifera mellifera* L. *mededelingen van de landbouwhogeschool te wageningen* 73: 1-155.

Capítulo I

**Efeito da aplicação tópica de Hormônio Juvenil em larvas sobre a
composição química cuticular e sinais visuais da face de fêmeas adultas
de *Mischocyttarus consimilis* (Vespidae: Polistinae)**

Efeito da aplicação tópica de Hormônio Juvenil em larvas sobre a composição química cuticular e sinais visuais da face de fêmeas adultas de *Mischocyttarus consimilis* (Vespidae: Polistinae)

Resumo: O Hormônio Juvenil é considerado o principal elemento na determinação de castas em insetos sociais, contudo, ainda é pouco compreendida sua ação na determinação de castas, sobretudo, em vespas sociais de fundação independente. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação tópica do Hormônio Juvenil sobre o perfil químico cuticular e padrões de reconhecimento visuais da face de adultos recém emergidos de *Mischocyttarus consimilis*. Os resultados demonstram que a aplicação de HJ em diferentes instares larvais leva a uma mudança significativa dos perfis químicos cuticulares e dos padrões de reconhecimento visual das faces. Os resultados fornecem mais evidências de que em espécies de vespas sociais de fundação independente a determinação de casta pode ser pré -imaginal, uma vez que os efeitos da aplicação de HJ na fase larval pode alterar o fenótipo de adultos recém emergidos. Outro aspecto importante é de que o efeito instar dependente aponta o 3^o e 4^o instares larvais, como aqueles mais sensíveis a elevação dos níveis normais de HJ.

PALAVRAS-CHAVE: Hidrocarbonetos cuticulares; determinação de castas, Vespidae; comunicação química.

Introdução

O sucesso da perfeita organização social dos insetos se deve entre outros aspectos a capacidade de reconhecimento entre seus membros, que é um fator determinante para evitar possíveis predadores, parasitas e até mesmo a perda de seus recursos (Mitra et al., 2014).

E, é por meio da detecção e emissão de compostos químicos que os insetos encontram parceiros para o acasalamento, alimento ou presa, escolhem local de oviposição, se defendem contra predadores e organizam suas colônias, no caso dos insetos sociais (Zarbin e Rodrigues 2009). Estes compostos podem atuar entre indivíduos da mesma espécie, sendo denominados de feromônios; ou entre espécies diferentes, os chamados aleloquímicos (Gullan e Cranston 2012).

Os feromônios são compostos químicos, produzidos por glândulas e transportados até a cutícula dos insetos os quais estão envolvidos em vários aspectos da vida dos insetos, como por exemplo, no reconhecimento de espécie, sexo, casta, sinais de dominância e fertilidade, feromônios sexuais de acasalamento, feromônios de agregação e feromônios de marcação de trilha (Zarbin e Rodrigues 2009; Gullan e Cranston 2012).

Desta maneira, a capacidade de reconhecimento entre indivíduos de uma mesma colônia é mediada por sinalizadores químicos, presentes mais especificamente na cutícula desses insetos (Howard e Blomquist 2005), formando padrões que podem variar de acordo com a função exercida, com o sexo, casta e mesmo idade, como já discutidos nos estudos de Antonialli et al., (2007) com a formiga *Ectatomma vizottoi*, em Kather et al., (2011) com *Apis mellifera*, em Neves et al., (2012) com *Mischocyttarus consimilis*, Mitra et al., (2015) com *Ropalidia marginata*.

Esses compostos químicos são conhecidos como hidrocarbonetos cuticulares (HCs) e são regulados por mecanismos exógenos e genéticos que atuam conjuntamente expressando um perfil químico único que compõem a cutícula de cada indivíduo, que podem ser parcialmente adquiridos nas primeiras horas de vida como já estudados nos trabalhos de Panek et al., (2001) com *Polistes fuscatus* e Neves et al., (2012) com *Mischocyttarus consimilis*.

Este perfil químico está intimamente relacionado ao tipo de funções que o indivíduo executa na colônia, ou seja, a sua casta (Singer et al., 1998). Por exemplo,

fêmeas alfas responsáveis pela reprodução são reconhecidas por possuírem compostos químicos cuticulares diferentes dos encontrados em operárias, como já descrito no estudo de Endler et al., (2006) com formigas *Camponotus floridanus*. Estes autores concluíram que 50 % dos compostos químicos cuticulares encontrados na cutícula das rainhas não estão presentes nas operárias. Oi et al., (2015) com a vespa *Vespula vulgaris* concluíram que alguns alcanos lineares de cadeia longa e os alcanos ramificados são sinalizadores de esterilidade nas operárias aumentando as evidências de que os compostos químicos cuticulares podem indicar o status fisiológico entre fêmeas em colônias de vespas sociais.

Trabalhos relativamente recentes têm mostrado que outra forma de se distinguir coespecíficos na sociedade de insetos, sobretudo em vespas, são os sinais visuais, em particular das faces (Tibbetts 2002; Tibbetts e Dale 2004; Tannure-Nascimento et al., 2008; Baracchi et al., 2015), que também podem servir para identificar a capacidade de dominância de um indivíduo, como mostra o estudo de Petrocelli et al., (2014) no qual quanto maior as manchas pretas no clipeo de fêmeas de *Polistes gallicus*, maior agressividade para manter seu status na colônia. Além disso, há indícios de que estes sinais visuais podem ser usados também para encontrar parceiros sexuais, como descrito no trabalho de de Souza et al., (2014), no qual avaliou-se que fêmeas de *Polistes simillimus* escolhem os machos com manchas pretas maiores na face e amarelas no abdômen. No entanto, ainda são poucos os trabalhos que trazem informações a cerca de como e quais sinais deste tipo são utilizados durante as interações nestas sociedades.

Por outro lado, um importante indutor de determinação de castas em insetos sociais é o Hormônio juvenil (HJ), que aparece com taxas mais elevadas na hemolinfa de rainhas quando comparados com seus títulos em operárias (Giray et al., 2005; Tibbetts e Huang 2010).

Em cupins, por exemplo, taxas de HJ diferenciados em larvas de operários são responsáveis pela formação de pré-soldados, soldados e ninfas (Park e Raina 2003). Já em formigas com diferenças morfológicas entre castas e subcastas, é determinada por taxas de hormônios juvenis próprios influenciados pela qualidade e quantidade nutricional (Nijhout e Wheeler, 1982), o mesmo pode ser visto em abelhas como *Apis mellifera* cujas taxas de HJ é regulado pela a alimentação larval diferenciada que origina rainhas e ou operárias (Laidlaw, 1992), o mesmo ocorrendo em *Polistes metricus* uma alimentação diferenciada na fase larval produz adultos maiores e com maior potencial reprodutivo (Rossi e Hunt 1988; Karsai e Hunt 2002).

Contudo em vespas de fundação independente, em que a diferenciação morfológica entre rainhas e operárias é quase inexistente, a determinação de castas é pouco compreendida, sendo baseada basicamente por padrões comportamentais e fisiológicos (Weaver 1966; Ross e Matthews 1991), neste contexto, a determinação de casta é conhecida como pós-imaginal (Solís e Strassmann 1990 Mead e Gabouriaux 1993). Nestas vespas sabe-se que a ação do HJ pode afetar a agressividade de rainhas, impedir o desenvolvimento ovariano de operárias, além de antecipar atividades de guarda e forrageio em operárias (Robinson e Vargo 1997; Giray et al., 2005).

Porém, alguns trabalhos vêm discutindo indícios de que ao menos em parte, a determinação de castas em vespas de fundação independente possa ser pré-imaginal com o HJ exercendo importante papel (Gadagkar et al., 1990; Keeping 2002; Judd et al., 2010). Neste contexto, há um único trabalho que de fato, testou o efeito da aplicação tópica de HJ em larvas de vespa social de fundação independente conseguindo resultados significativos que aumentarem os indícios da determinação de casta pré-imaginal neste grupo de vespas (Montagna et al., 2015).

Além disso, há uma relação estreita entre os efeitos do HJ sobre o perfil químico cuticular, uma vez que ela afeta as funções que o indivíduo executa na colônia (Yzzo et al., 2010). Lengyel et al., (2007) investigou a influencia do HJ na composição química cuticular, e na divisão de trabalho da formiga *Myrmicaria eumenoides*, e perceberam que a aplicação de HJ modifica o perfil químico cuticular de operárias, e que forrageadoras apresentam maior nível de HJ em sua hemolinfa

Já Sledge et al., (2004) testaram a relação das taxas de HJ com o status reprodutivo de *Polistes dominula* em diferentes fundadoras solitárias e fundadoras por associação na fase de pré- emergência, com base no tamanho do *Corpora allata* e os correlacionou com as proporções de HCs e o desenvolvimento ovariano das fêmeas, constatando que as fêmeas de colônias fundadas por associação apresentaram *Corpora allata* significativamente maior assim como perfis de HCs diferentes dos de fundadoras solitárias.

Contudo, ainda são poucos os trabalhos que investigaram a ocorrência de determinação de castas pré-imaginal em vespas sociais (Montagna et al., 2015), sendo ainda mais raros aqueles que já avaliaram a relação entre os efeitos dos níveis de HJ em seus perfis químicos cuticulares e sinais visuais. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da elevação das taxas de HJ em larvas por aplicação tópica em diferentes instares larvais sobre o perfil químico cuticular e sinais visuais da face de fêmeas recém-emergidas de *Mischocyttarus consimilis*.

Hipóteses

A primeira hipótese deste estudo é que a aplicação tópica de HJ em imaturos possa alterar o padrão de compostos químicos cuticulares de fêmeas recém-emergidas da vespa social *Mischocyttarus consimilis*.

A segunda hipótese do trabalho é que haverá variação de respostas, quanto ao perfil de compostos químicos cuticulares e sinais visuais da face quando aplicação tópica de HJ for feita em ínstares larvais diferentes.

Material e Métodos

Tratamentos e coleta dos indivíduos

Os estudos foram conduzidos a partir da manipulação experimental de 8 colônias da vespa eussocial *Mischocyttarus consimilis*, nidificadas em áreas rurais no município de Dourados- MS (22°13'16"S, 54°48'20"W). Estas colônias estavam na fase de operárias em que só eram produzidas fêmeas para manutenção e defesa da colônia (Jeane, 1972). Todas as colônias foram transferidas para abrigos artificiais (AA) construídos de acordo com o descrito por Montagna et al., (2015), como visto na Figura 1, sendo confeccionadas em madeira, medindo 1,2 x 1,2 x 2,5 m, e cobertos com telhas de regulação térmica. Cada AA continha em seu interior quatro baias móveis posicionadas horizontalmente a uma altura de 1,90 m do chão. As baias foram fixadas por meio de uma dobradiça em um sarrafo transversal, as quais permitiram um giro individual de 180 graus. Cada baia recebeu uma única colônia, que foi transferida e fixada de acordo com Prezoto e Machado (1999). O giro das baias permitiu efetuar a aplicação tópica do HJ numa condição a favor da gravidade e precisamente sobre as larvas selecionadas para o tratamento. Para obter o máximo de precisão na quantidade de HJ despejado sobre a larva foi utilizado um micropipetador automático com capacidade volumétrica máxima de 02 µl seguindo a metodologia já utilizada por Montagna et al., (2015).

Para avaliar se houve diferenças de respostas quanto as idades larvais, a aplicação de HJ foi efetuada em larvas de 3^o, 4^o e 5^o ínstares baseado nos resultados obtidos por Montagna et al., (2015). Para cada um dos três ínstares definido foi realizado os seguintes tratamentos em um lote de larvas da mesma colônia: (a) larvas com uma única aplicação de HJ na concentração de 1µg de HJ em µl de acetona (tratamento); (b)

larvas com uma única aplicação de 1µl de acetona (controle 1) e (c) larvas sem aplicação alguma (controle 2), conforme Antonialli-Junior e Cruz- Landim (2006) e Shorter e Tibbetts (2009).

A concentração de HJ usada foi baseada no estudo de Montagna et al., (2015). A determinação do instar larval foi realizada medindo a cápsula cefálica das larvas utilizadas em cada tratamento, baseando-se pela regra de Dyar (1980). Para controle do instar foi extraído do ninho uma larva de mesma idade daquelas do tratamento para medição da cápsula cefálica. Estudos prévios já realizados reconhecem cinco instares para as larvas de *M. consimilis*.

Para tornar possível as aplicações nos diferentes instares larvais e a coleta dos adultos recém-emergidos foi realizado o método de mapeamento diário do ninho em papel hexagonado impresso (Giannotti, 1998). Todos os adultos recém-emergidos de larvas sob efeito dos dois tratamentos, e o mesmo número sem nenhum tratamento, foram coletados, individualizados, sacrificados e conservados por congelamento, evitando-se assim o uso de qualquer tipo de fixador ou conservante químico que poderia reagir com os elementos químicos da cutícula, de acordo com metodologia proposta por Montagna et al., (2015) para avaliar se houve variação dos seus perfis de HCs.

Análise do efeito da aplicação tópica de HJ sobre a química cuticular por Espectroscopia Óptica por Transformada de Fourier no Infravermelho Médio por Detecção Fotoacústica

Para análise da variação dos compostos químicos cuticulares foi executada a técnica não destrutiva de Espectroscopia Óptica por Transformada de Fourier no Infravermelho Médio por Detecção Fotoacústica (*Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy- FTIR-PAS*). Esta técnica vem sendo usada com sucesso, quando se pretende avaliar se há diferenças entre grupos, sem pretensão de se avaliar quais são os compostos que geram as diferenças, já aplicadas em estudo com formigas e vespas sociais (Tofolo et al., 2014; Neves et al., 2013; Neves et al., 2012).

Esta técnica é mais rápida e barata do que a usual, cromatografia gasosa, e permite a análise de ambas as propriedades térmicas e ópticas dos materiais (Michaelian 2003). Outra vantagem desta técnica é que a necessidade de preparação da amostra é mínima, além da capacidade de ler materiais opacos e sólidos, e não é destrutiva (Michaelian 2003) e por isto pode ser utilizada para obter de forma ágil, resultados confiáveis.

Uma vez que a intenção não foi descrever os compostos responsáveis pelas diferenças encontradas, as leituras foram feitas de forma padronizada no tórax. Estas amostras foram colocadas previamente em estufa a vácuo por 48 horas para minimizar a absorção de umidade, a qual pode interferir no espectro. Neste estudo, a espectroscopia fotoacústica de infravermelhos foi usada para ler a radiação absorvida pela amostra do infravermelho médio a região, compreendendo a faixa espectral de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Esta região é sensível às vibrações de grupos químicos moleculares, o que permite a identificação de radicais moleculares e tipos de ligações químicas nas amostras (Smith 1999). Durante a leitura, o sistema foi purgado com ar seco para remover partículas, vapor de água e CO_2 , e a câmara fotoacústica acoplado ao microfone foi purgada com gás hélio para aumentar a sensibilidade. Para cada amostra, foi obtido um espectro médio de 64 varreduras com uma resolução de 8 cm^{-1} .

As possíveis diferenças entre a composição química da cutícula dos adultos emergidos de larvas sob diferentes tratamentos foram avaliadas em intensidade dos picos dos espectros médios, pela análise de função discriminante. Nesta análise o valor de Wilks' lambda é utilizada como uma medida de diferença entre os grupos, sendo que valores próximos a zero indicam que os grupos não se sobrepõem, enquanto valores próximos a um indicam elevada sobreposição entre os grupos e consequente inexistência de diferença significativa entre eles (Quinn e Keough 2005).

Análise do efeito da aplicação tópica de HJ sobre a química cuticular por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas

Para complementar as análises e avaliar as diferenças quali e quantitativas geradas pela aplicação de HJ, as mesmas amostras avaliadas por FTIR-PAS foram avaliadas pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM). Cada amostra foi imersa em um vidro de penicilina composto por $2000 \mu\text{L}$ de hexano durante 2 minutos. Posteriormente o soluto, resultante da extração, foi submetido à secagem, com auxílio de capela e posteriormente congelados por no máximo 30 dias. Para as análises cromatográficas cada extrato foi dissolvido em $50 \mu\text{L}$ de hexano.

Para análise dos compostos cuticulares de cada amostra foi empregado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM). As condições de análises foram testadas com as amostras reais. Para obter uma melhor separação

cromatográfica foram avaliados parâmetros como vazão, fase estacionária e temperaturas do detector, forno e injetor.

As amostras foram analisadas por meio do cromatógrafo gasoso (GC-2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japan) com detector de massas (GC-MS Ultra 2010, Shimadzu, Kyoto, Japã), usando uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J & W, Folsom, California) 5% de fenil-dimetilpolisiloxano em sílica fundida capilar (30 m de comprimento x 0.25 mm de diâmetro x 0.25 µm de espessura). As condições de análise foram: gás carregador de hélio (99.999% e velocidade de fluxo de 1.0 mL min⁻¹); volume de injeção de 1 µL, modo de injeção *splitless*. Rampa de aquecimento com temperatura inicial de 150 °C alcançando 300°C à 3°C min⁻¹ e permanecendo na temperatura final por 10 minutos. Temperatura do injetor de 220°C. As temperaturas do detector e da linha de transferência foram de 250°C e 200°C respectivamente. Os parâmetros de varredura do EM incluíram voltagem de ionização de impacto de elétron de 70 eV, uma faixa de massa de 45 a 600 m/z e um intervalo de varredura de 0.3 s.

Para identificação dos compostos analisados, foram empregados os índices de retenção calculados empregando uma série de alcanos lineares, a biblioteca do equipamento, espectros de massas, e padrões de alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos empregados para auxiliar na identificação dos compostos. Também foi feita a identificação de compostos que não dispomos de padrões, por meio da interpretação dos espectros de massas associados a ferramentas acima descritas.

As possíveis diferenças entre a composição química da cutícula dos adultos emergidos de larvas sob diferentes tratamentos foram avaliadas em relação ao percentual de área relativa dos picos dos cromatogramas, pela análise de função discriminante, para esta análise foram utilizados todos os picos detectados nas amostras (Quinn e Keough, 2005).

Análise do efeito da aplicação tópica de HJ sobre os sinais visuais da face

Todas as fêmeas que tiveram seus perfis químicos cuticulares avaliados tiveram suas cabeças separadas e suas antenas removidas, para avaliar variações no padrão de coloração das faces, foram ainda coletadas 8 rainhas de diferentes colônias.

Para avaliar se rainhas podem apresentar padrões de sinais faciais distintos daqueles de operárias foram coletadas 8 rainhas, após avaliação de seu status por meio de análise de comportamento que as definem (Torres et al., 2012) em colônias nidificadas em áreas do entorno do município de Dourados- MS (22°13'16"S, 54°48'20"W).

As faces de cada um dos indivíduos submetidos aos tratamentos nos 3^o, 4^o e 5^o instar, grupo controle e as rainhas foram fotografadas por meio de uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio Zeiss Stemi 2000C adaptado com uma ocular micrométrica (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany). As cabeças foram posicionadas com vista frontal, e as imagens serão analisadas pelo programa Image J (disponível online em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Foi calculada a largura máxima da cabeça na vista frontal, uma vez que segundo Eickwort (1969) esta medida é considerada um forte preditor do tamanho corporal em vespas e a porcentagem da área da mancha (área vermelha da Figura 2).

As possíveis diferenças entre as medidas das variáveis medidas foram avaliadas por meio de análise de Covariância (ANCOVA) em que a largura máxima da cabeça foi considerada a variável dependente e a porcentagem da mancha a co-variável com nível de significância de $p > 0,05$.

Foi aplicado ainda uma Análise de Variância (ANOVA) para verificar diferenças entre os grupos quanto a largura máxima da cabeça com nível de significância de $p > 0,05$.

Resultados

Análise do efeito da aplicação tópica de HJ sobre a química cuticular por FTIR-PAS

A inspeção visual dos espectros médios obtidos por FTIR-PAS mostra que as diferenças entre os grupos estudados são sutis. Entretanto é possível perceber visualmente que os picos 13 (grupo funcional -N-H-) e o 6 (grupo funcional CH₂) aparecem mais intensos para o grupo que recebeu aplicação de HJ no 4^o instar larval, já o pico 7 (grupo funcional N-H e/ ou C-N (Amida II) aparece com menor intensidade para o grupo controle. É possível perceber ainda que o pico 14 (grupo funcional -N-H-) aparece com maior intensidade no espectro médio dos grupos controle e no grupo que recebeu aplicação de HJ no 3^o instar larval (figura 3).

A análise discriminante dos valores referentes as intensidades dos picos dos espectros médios provenientes das leituras por FTIR-PAS demonstra que os perfis químicos cuticulares dos adultos emergidos de larvas sob aplicação tópica de HJ em larvais distintos, são significativamente diferentes com Wilks'lambda = 0.329 e F=2.847 $p = 0.0012$, no qual a 1^o raiz explica = 69% dos resultados e a 1^o raiz e 2^o raízes juntas

explicam 84% dos resultados, no qual dos 14 picos analisados (Figura 3 e Tabela 1), 5 picos foram significativos para separação dos grupos (Figura 4), 1041, 1373, 1650, 2962 e o pico 3093 cm^{-1} (Tabela1)

Análise do efeito da aplicação tópica de HJ sobre a química cuticular por Cromatografia Gasosa

A inspeção visual dos cromatogramas representativos obtidos por CG-EM (Figura 5) mostra que os grupos que receberam aplicação de HJ nos 3^o, 4^o e 5^o instares larvais são diferentes em relação ao grupo controle. É possível notar visualmente, por exemplo, que dos picos indicados, o pico 1 (Pentadecano) apareceu com maior intensidade no grupo que recebeu HJ no 3^o instar larval. Já o pico 5 (3-Metilheneicosano) apareceu com maior intensidade em todos os tratamentos e com menor intensidade no grupo controle (Figura 4).

A análise discriminante demonstra que os perfis químicos cuticulares dos adultos emergidos de larvas sob aplicação tópica de HJ em diferentes instares larvais e controle, são significativamente diferentes com Wilks' $\lambda = 0,000$; $F = 13.416$; $p\text{-tail} = 0,0000$ $p < 0,05$, sendo que a 1^o raiz explica = 53% dos resultados e a 1^o raiz e 2^o raízes juntas explicam 87% dos resultados.

Foram detectados 156 picos e destes 81 foram identificados (Tabela 2), restando ainda 75 correspondentes aos compostos desconhecidos. A análise estatística apontou 23 picos como significativos para separação dos grupos, com destaque a 10 mais significativos estatisticamente na Figura 5 e Tabela 3.

Os resultados mostram que os efeitos mais visíveis em termos de teores, foi quando a aplicação de HJ foi feita no 4 instar larval, resultando em uma maior concentração de alcanos lineares nos adultos recém-emergidos, em relação ao controle, principalmente quando a aplicação de HJ foi feita no 4^o instar larval (Figura 5). Em contrapartida este foi o tratamento no qual o adulto apresentou menor teor de alcanos ramificados.

De todos os grupos cujas larvas foram submetidas ao tratamento com HJ, as fêmeas que receberam HJ no 3^o instar larval foram as que apresentaram maior teor de alcanos ramificados.

Em todos os tratamentos foram encontrados os alcenos -Tricosene; Y-Tricosene, Heptacosene e Hentriacontene (Figura 5). Os compostos considerados majoritários

presentes em todas as amostras submetidas aos diferentes tratamentos foram: 3-Metilheptacosano; 3-Metilheptacosano; e o Nonacosano;

No entanto, alguns compostos foram majoritários para alguns grupos em particular como: 3-Metiloctadecano (3^o e o 5^o instar); Eicosano (5^o instar); 9-Metilheptacosano (4^o, 5^o instar e controle); Tricosano (3^o, 4^o e 5^o instar); X-Metilheptacosano (3^o instar); 3,11 Dimetilheptacosano (3^o instar); e o X-Metiltetriacontano (3^o instar); 3-Metilnonacosano (3^o instar e controle); 11-Metiltetriacontano (3^o e 4^o instar);

Além disso, alguns compostos ocorrem exclusivamente em alguns tratamentos como o Hexadecano, Heptadecano, 5-Metilheptadecano e o 3,11-Dimetilheptacosano que ocorreram somente em recém-emergidas cuja a aplicação foi feita no 3^o instar. O 2-Metiltetriacontano, Tetriacontano e o Tetrtetriacontano, no 4^o instar. O composto 14-Metiltetrtetriacontano só ocorreu em recém emergidas que receberam o tratamento no nos 5^o e aquelas tratadas no 3^o instar. E os compostos 9,15-Dimetilnonacosano e X-metiltetrtetriacontano ocorrem somente no controle (Tabela 2)

Análise do efeito da aplicação tópica de HJ sobre os sinais visuais da face

Apenas pela largura da cabeça é possível perceber que há diferenças perceptíveis entre as cabeças de rainhas e operárias (controle) e também entre este ultimo grupo e aquelas sob efeito dos diferentes tratamentos (Figura 8), a análise estatística Anova mostrou que há diferenças significativas entre os grupos analisados quanto a largura máxima da cabeça com valor de $F= 5632$ e $p=0,001$.

A análise estatística ANCOVA mostra que considerando a área da macha avaliada, em consideração a largura da cabeça, uma diferença s estatística significativa entre as rainhas, controle os tratamentos nestes dias (Figuras 8 e 9; Tabela 4).

Por outro lado, a análise mostra que não há diferenças significativas destes parâmetros entre rainhas e os tratamentos no 3^o instar (Tabela 4).

Discussão

Os resultados demonstram que a aplicação tópica de HJ em diferentes estágios larvais, altera significativamente a composição da cutícula de fêmeas adultas recém emergidas e que os resultados são instar dependentes, corroborando os resultados

encontrados por Montagna et al., (2015), que demonstrou que o aumento das taxas de HJ nos estágios larvais altera o fenótipo de fêmeas adultas.

Embora os resultados das duas técnicas, tenha demonstrado que a composição química cuticular foi alterada significativamente com os tratamentos, a técnica de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM) aponta com mais clareza que os tratamentos nos 3^o e 4^o instares larvais foram os que surtiram maiores efeitos em relação ao controle. Montagna et al., (2015) também aponta estes instares, sobretudo o 3^o como o momento chave para obter os resultados mais significativos com a aplicação de HJ nos estágios larvais. Estes autores demonstraram que quando a aplicação de HJ é feita no 3^o instar, fêmeas adultas são significativamente maiores, permanecem mais tempo no ninho e recebem menos agressão do que o grupo controle e os outros tratamentos.

Segundo Penick et al., (2012), existe uma fase mais sensível à aplicação do HJ, ao longo do estágio larval que induz a maiores mudanças no adulto. Neste estudo os autores concluíram que a aplicação do HJ nos 3^o e 4^o instares larvais leva à fêmeas adultas da formiga *Harpegnathos saltator* a uma maior propensão a se tornarem rainhas.

Assim como nos trabalhos de Antonialli-Júnior e Cruz-Landim (2006 e 2009) com *Apis mellifera* verificaram que a aplicação do HJ inibiu parcialmente a morte celular dos ovários, e o efeito maior quanto aos valores das médias dos ovários e ao número de ovários ocorreu quando o hormônio foi aplicado no 3^o instar larval.

Pelos resultados obtidos por ambas as técnicas é possível concluir que existem diferenças significativas entre os grupos, contudo por CG-MS (Figura 5), é possível perceber menor sobreposição entre os grupos, ficando mais claro que os tratamentos no 3 e 4 dias são aqueles que surtiram diferenças mais significativas com relação ao controle.

Os resultados obtidos por meio da análise por cromatografia reforçam que a aplicação de HJ altera significativamente a composição cuticular, porque alguns compostos aparecem exclusivamente quando o tratamento é aplicado em dias diferentes com relação ao controle (Tabela 2). Comparado às outras fêmeas do tratamento, nós observamos que quatro compostos majoritários foram expressos exclusivamente na cutícula das fêmeas que receberam a administração de HJ no terceiro instar larval. Em particular um dos compostos exclusivos e majoritário para o 3^o instar e que também foi um dos 10 picos mais expressivos para separação dos grupos na análise estatística foi o 3,11-dimetilheptacosano, que segundo Heinze et al., (2002) esta relacionado com a

atividade reprodutiva na formiga *Pachycondyla inversa*, e também no estudo de D'Ettorre et al., (2004) cuja as operárias dessa mesma espécie são capazes de perceber este composto que é liberado pelas rainhas como um sinal honesto de fertilidade.

De acordo com a Figura 4 há um maior número de alcanos lineares e ramificados em relação aos alcenos nas amostras analisadas, como já descrito por Tanure-Nascimento et al., (2007) em *Polistes satan*, Sledge et al., (2001) com *Polistes dominula*, em abelhas nos trabalhos de Arnold et al., (1996) e Dani et al., (2005), em formigas da espécie *Pogonomyrmex barbatus* estudadas por Wagner et al., (2001).

Os Metil-ramificados representaram a maioria dos compostos majoritários e também os principais responsáveis pela separação dos grupos analisados, o que reforça o entendimento de que esses compostos assim como os alcenos tenham importância fundamental para o processo de comunicação química, enquanto que os alcanos lineares seriam os principais compostos que protegeriam os insetos contra a dessecação (Dani et al., 2001; Gibbs 2002; Monnin 2006).

Por outro lado, não se pode negar que os alcanos lineares possam exercer algum papel no reconhecimento intraespecífico, visto que o trabalho de Lorenzi et al., (2004) em operárias de *Polistes dominula*, tratadas com extratos de alcanos lineares com menos de 24hs de vida não foram aceitas por suas companheiras, sugerindo que estes compostos também podem ser utilizados como sinais no reconhecimento intracolônia.

Dessa maneira os resultados encontrados neste estudo sugerem que a cutícula das fêmeas que emergem de larvas tratadas com HJ apresentam diferenças tanto qualitativas quanto quantitativas de compostos da cutícula (Tabela 2 e Figura 5).

Assim, estes resultados, de fato, corroboram os de Montagna et al., (2015) que concluíram que fêmeas emergindo de larvas tratadas no terceiro instar apresentam maior tamanho do corpo e, portanto, maior potencial para serem gíneas, inclusive perfil químico cuticular que sinaliza seu maior potencial reprodutivo. Judd et al., (2010) estudando a vespa social *Polistes metricus* avaliaram que larvas de gíneas apresentam nutrientes circulantes na hemolinfa que diferem das larvas de operárias, o que sugere uma possível alimentação diferencial entre essas larvas. Também apresentam evidências de que a expressão de compostos cuticulares em fêmeas recém-emergidas deve ocorrer de acordo com a dieta larval que pode alterar os níveis de HJ circulante na hemolinfa.

A análise dos efeitos dos tratamentos com HJ sobre os padrões de sinais visuais e a própria largura da cabeça mostra que não só a espécie apresenta estes padrões para sinalizar o papel do indivíduo na colônia como já descrito por Tanure-Nascimento et al., (2008) na espécie *Polistes satan*, Petrocelli et al., (2014) na espécie *Polistes gallicus* e

em *Liostenogaster flavolineata* por Baracchi et al., (2015), como também reforça as evidências de que neste grupo de vespas sociais, ao menos em parte, a determinação de castas pode ser pré-imaginal. Neste contexto, os efeitos dos tratamentos corroboram com os resultados de Montagna et al., (2015) que concluíram que as aplicações de HJ nos 3^o e 4^o instares são aquelas que surtem os efeitos mais significativos (Figuras 8 e 9 e Tabela 4).

Dessa maneira aceitamos as duas hipóteses de que a aplicação tópica de HJ em diferentes instares altera o padrão dos compostos químicos cuticulares, e os sinais da face de fêmeas recém-emergidas.

Portanto, os resultados somados aos descritos anteriormente com esta espécie fornecem evidências de que em espécies de vespas sociais de fundação independente a determinação de casta pode ser pré-imaginal, uma vez que os efeitos da aplicação de HJ na fase larval pode alterar o fenótipo de adultos recém emergidos, dentre estes, sua química cuticular e padrões de reconhecimento visual das faces. Além disso, outro aspecto importante é de que o efeito instar dependente aponta o 3^o e 4^o instares larvais como aqueles mais sensíveis a elevação dos níveis normais de HJ.

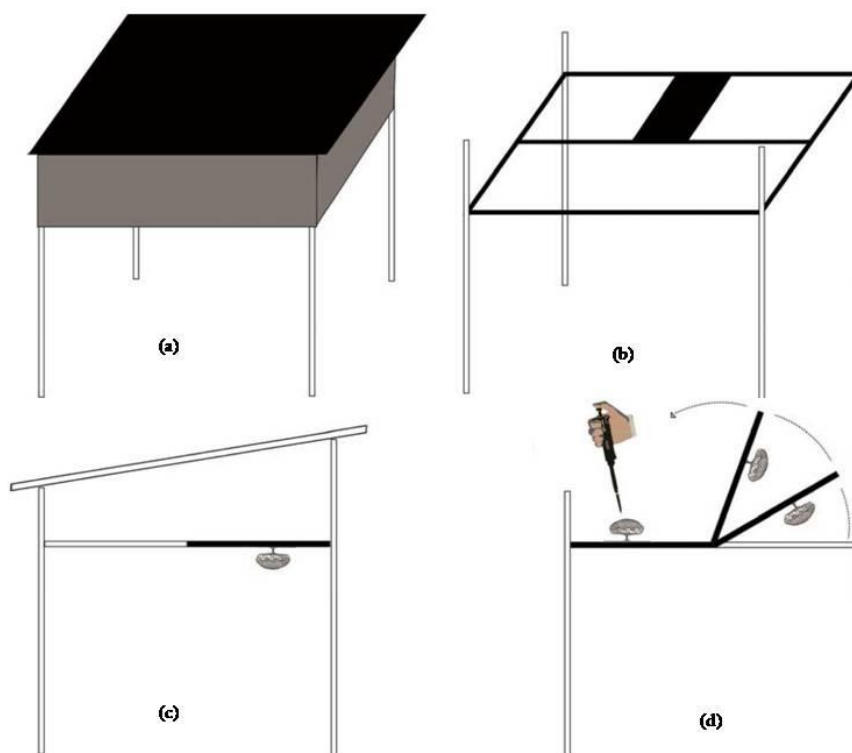


Figura 1: Esboço esquemático do abrigo artificial usado para a manutenção da colônia. (a) Vista do esquema geral. (b) Vista interna, indicando a posição exata da placa de madeira usada para fixação colônia. (c) Vista mostrando a posição da colônia ligada à placa de madeira. (d) Procedimento para a aplicação tópica de hormônio juvenil girando a placa de madeira de 180 graus (retirado de Montagna et al., 2015).

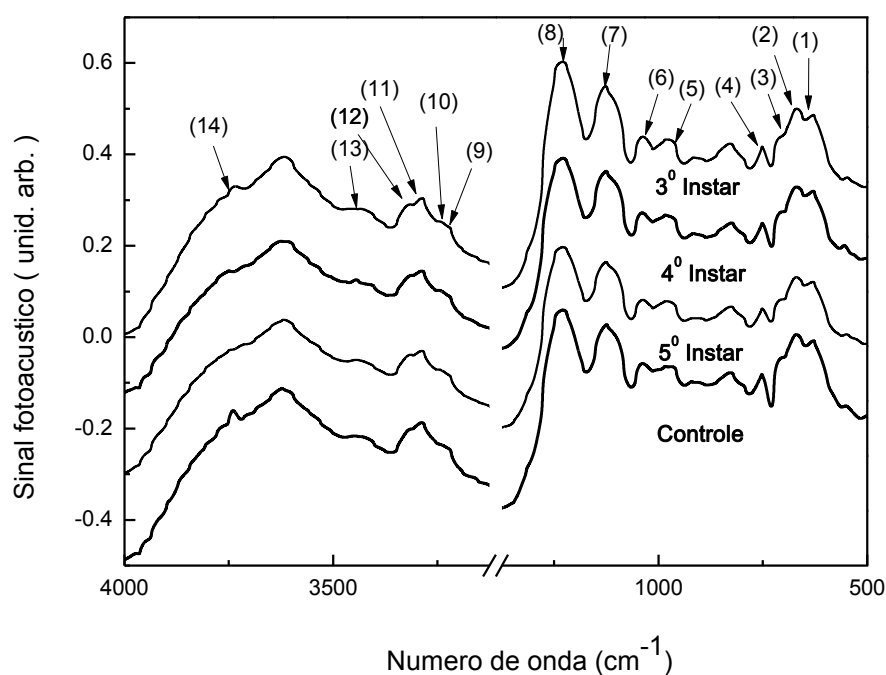


Figura 2: Curva média para cada grupo de espectros de absorção no infravermelho médio dos tórax de *Mischocyttarus consimilis* submetidas à aplicação de Hormônio Juvenil em diferentes instares larvais pela técnica de FTIR-PAS com indicação dos picos utilizados na análise estatística.

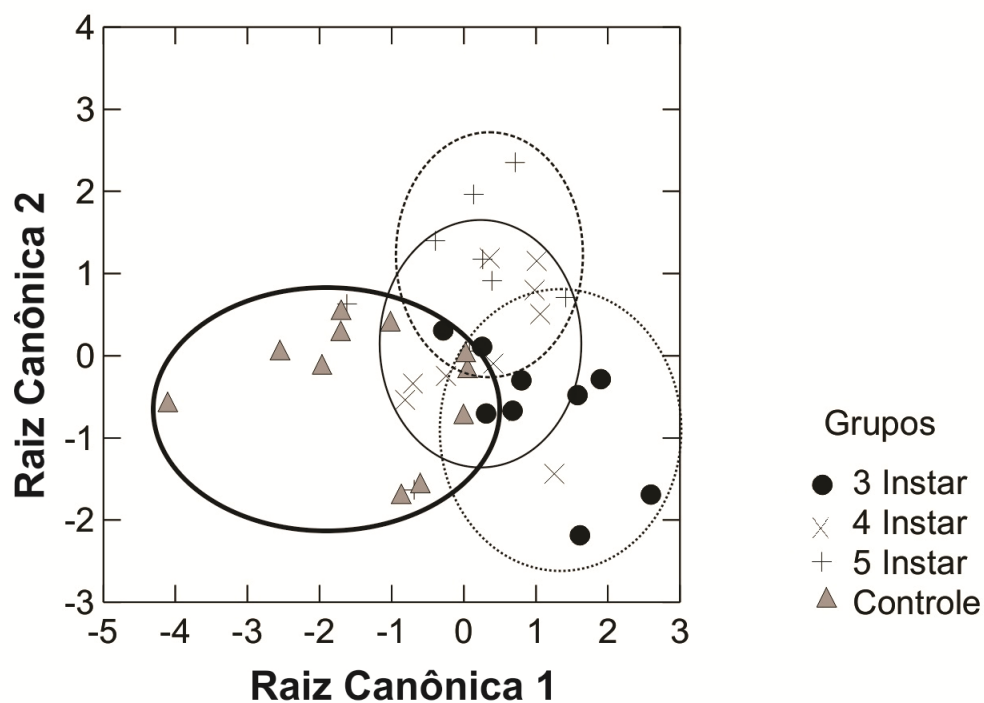


Figura 3: Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação em diferentes instares larvais de *Mischocyttarus consimilis* submetidas à aplicação de Hormônio Juvenil e o grupo controle analisados pela técnica de FTIR-PAS.

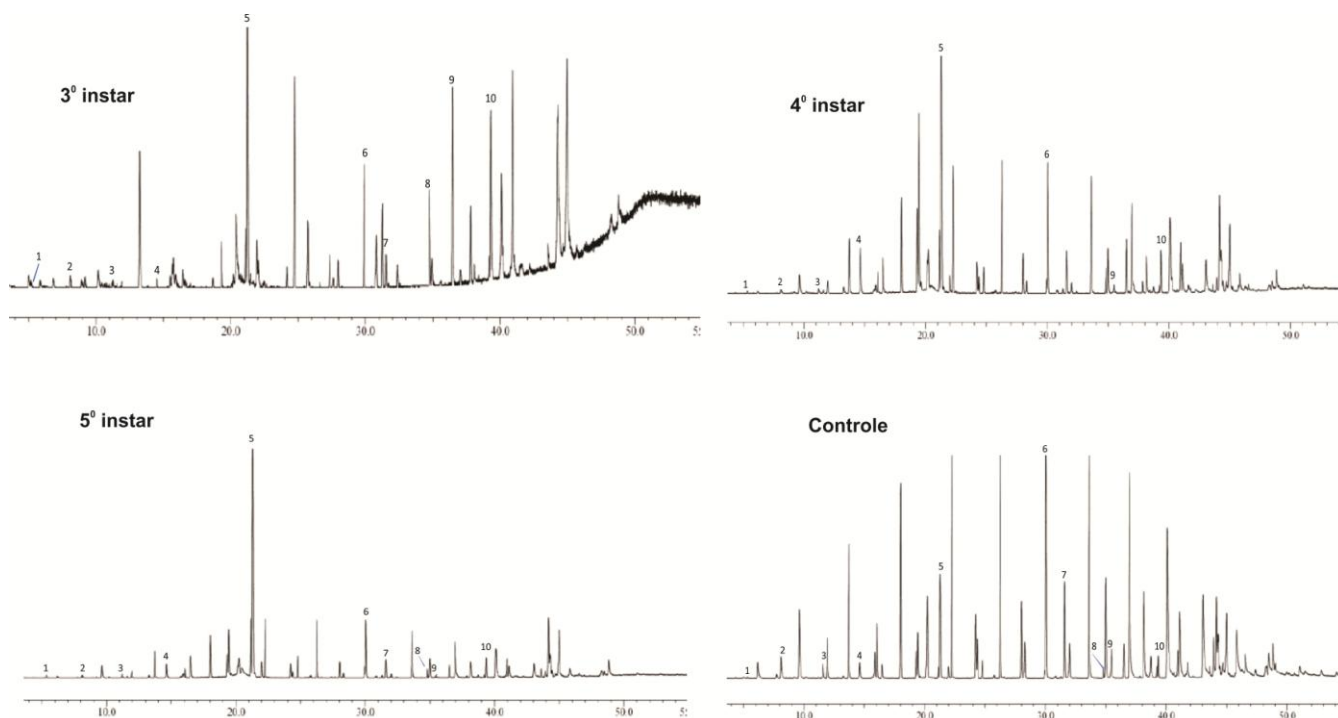


Figura 4. Cromatogramas representativos dos instares larvais submetidos à aplicação de Hormônio Juvenil (3^o, 4^o e 5^o instares) e o controle, com indicação dos 10 compostos que foram estatisticamente mais significativos para separação dos grupos* 1=Pentadecano; 2=Desconhecido; 3= Octadecano; 4= Desconhecido; 5= 3-Metilheptacosano; 6= Pentacosano; 7= 9,13 Dimetilpentacosano; 8= Y-Metilheptacosano; 9= 7-Metilheptacosano; 10= Nonacosano

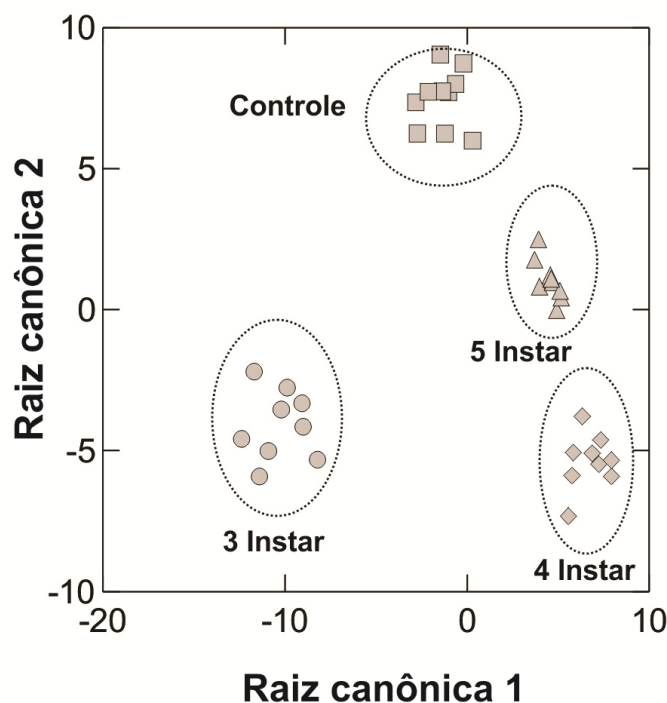


Figura 5. Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação em diferentes instares larvais de *Mischocyttarus consimilis* submetidas a aplicação de Hormônio Juvenil e o grupo controle analisados pela técnica de CG-EM.

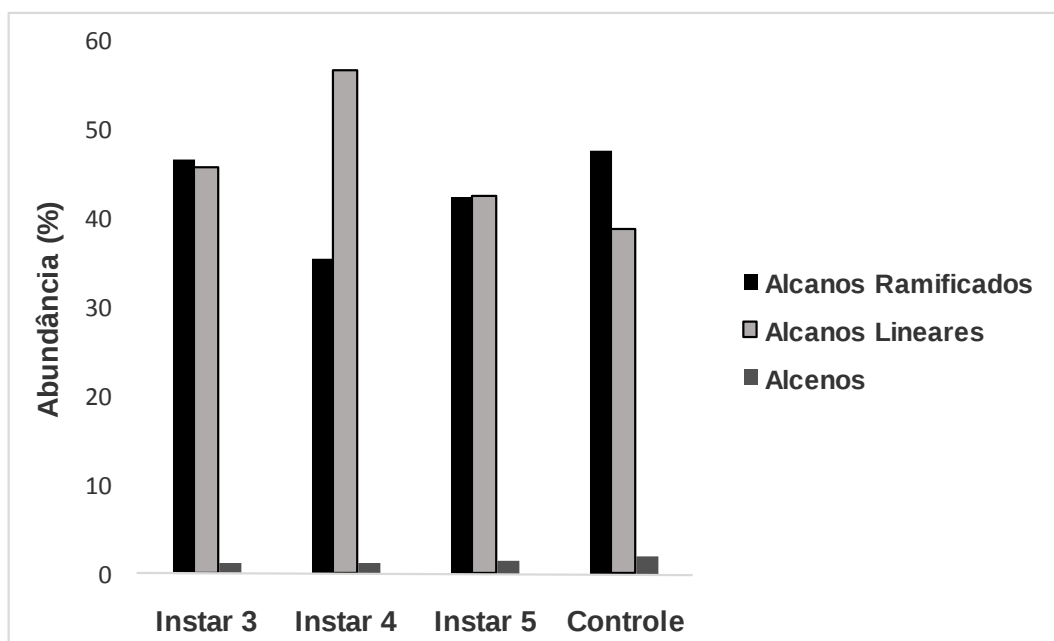


Figura 6. Abundância relativa em porcentagem dos compostos identificados para cada instar submetido à aplicação de Hormônio Juvenil e o grupo controle analisados por CG-EM de *Mischocyttarus consimilis*.

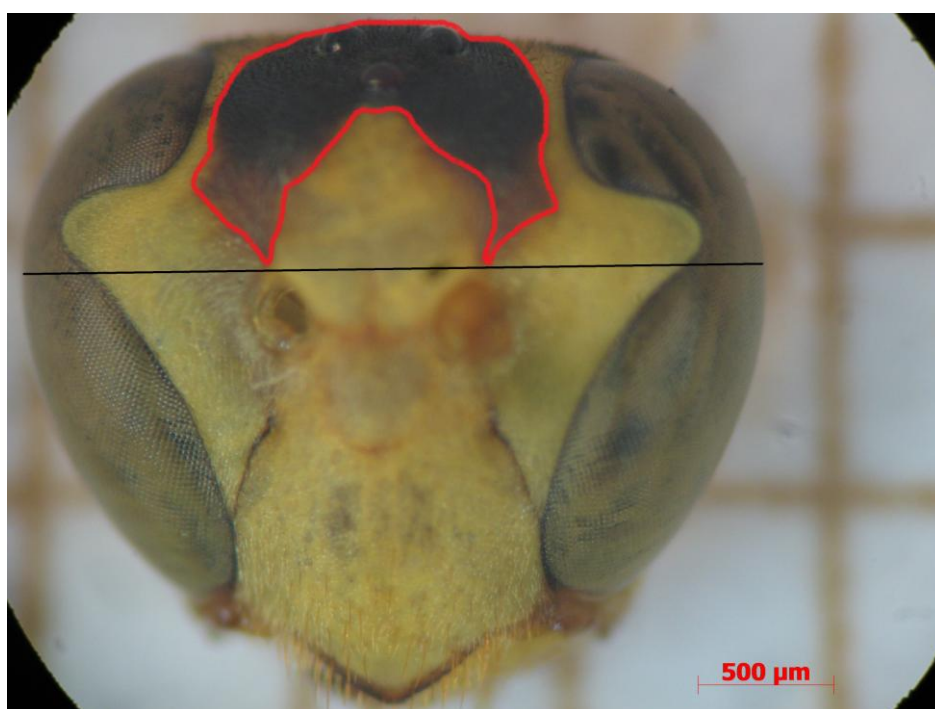


Figura 7. Esquema da cabeça com destaque as medidas utilizadas, em preto a largura máxima da cabeça (mm), e em vermelho a área com a área da mancha medida (mm²) de *Mischocyttarus consimilis*.

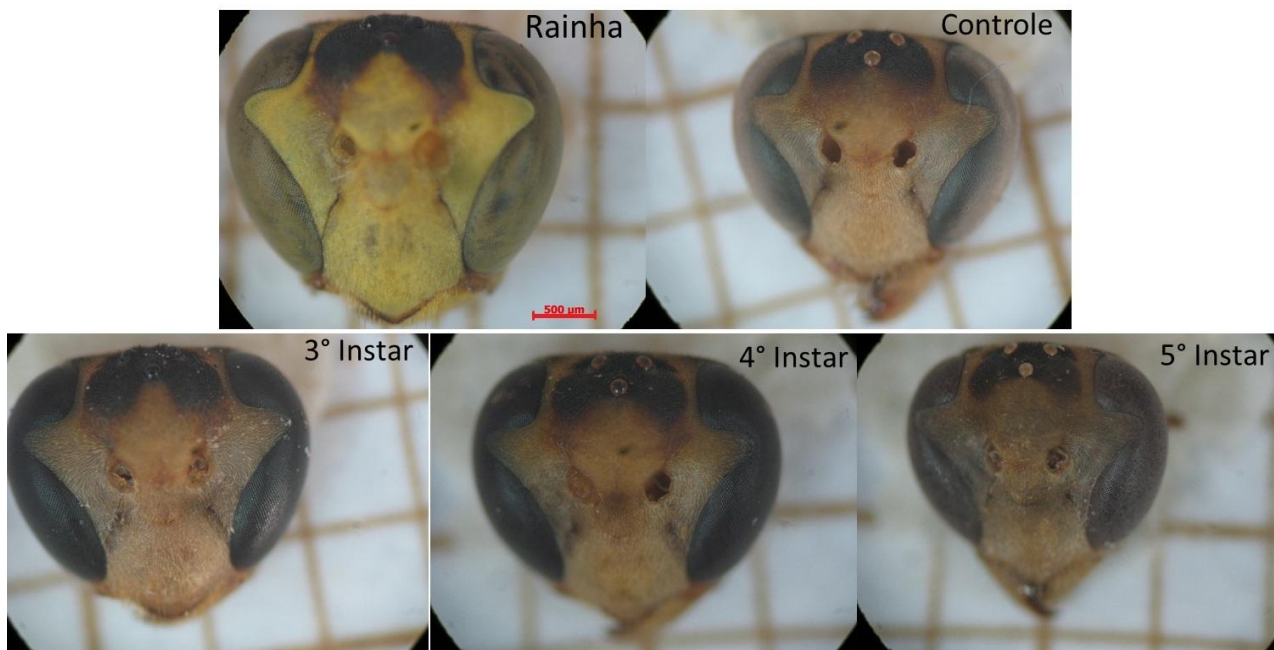


Figura 8: Faces das fêmeas de *Mischocyttarus consimilis* submetidas a aplicação de HJ nos 3^o, 4^o e 5^o instar, controle e rainha mostrando as diferenças de formatos de cabeça.

Figura 9. Box- Plot com a largura média das cabeças nos diferentes grupos de fêmeas *Mischocyttarus consimilis*.

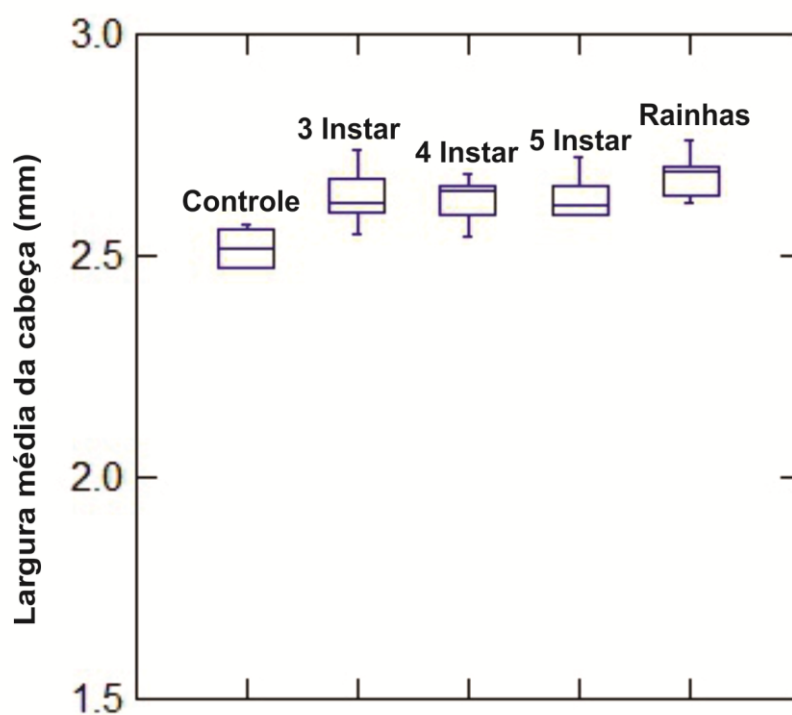


Tabela 1. Número de onda, coeficientes das duas raízes canônicas, grupo funcional, e modo vibracional dos picos identificados nos espectros de absorção no infravermelho médio dos tórax das vespas submetidas à aplicação de HJ em diferentes instares larvais e analisados por FTIR-PAS.

Pico	Número de onda (cm ⁻¹)	1 ^o Raíz Canônica	2 ^o Raíz Canônica	Grupo Funcional	Modo de Vibração
(1)	1041	2,724	3,529	C-H	Dobramento no plano
(2)	1079	-	-	C-H	Balanço no plano
(3)	1110	-	-	C-H	Balanço no plano
(4)	1157	-	-	C-H	Balanço no plano
(5)	1373	-1,017	2,290	C-CH ₃	Dobra simétrico
(6)	1450	-	-	CH ₂	Tesoura
(7)	1542	-	-	N-H e/ ou C-N (Amida II)	Balanço no plano
(8)	1650	1,723	2,973	N-H e/ ou C-N (Amida II)	Dobramento no plano e ou / Estiramento assimétrico
(9)	2854	-	-	CH ₂	Estiramento simétrico
(10)	2877	-	-	CH-CH ₃	Estiramento simétrico
(11)	2931	-	--	CH ₂	Estiramento assimétrico
(12)	2962	-0,890	4,841	CH ₃	Estiramento assimétrico
(13)	3093	2,949	1,965	N-H	Flexão Harmônica
(14)	3425	-	-	N-H	Estiramento

Tabela 2. Médias da abundância relativa e seus desvios-padrão para os compostos cuticulares identificados nos diferentes instares larvais que foram submetidos à aplicação de HJ o grupo controle em *Mischocyttarus consimilis* em negrito os compostos majoritários analisados por CG-EM.

Compostos	Índice Calculado	3º Instar Média±DP (%)	4º Instar Média±DP (%)	5º Instar Média±DP(%)	Controle Média±DP(%)
Pentadecano	1500	Tr	Tr	Tr	Tr
Hexadecano	1600	Tr	-	-	-
Heptadecano	1700	Tr	-	-	-
Octadecano	1800	Tr	Tr	Tr	Tr
3-Metiloctadecano	1876	2,32±2,27	1,36±1,58	3,57±9,76	0,71±0,76
Nonadecano	1900	0,55±1,01	0,32±0,70	0,52±1,02	0,61±1,31
X-Metilnonadecano	1975	0,43±0,41	0,33±0,24	1,15±2,91	0,33±0,31
Eicosano	2000	2,08±1,24	2,16±1,26	5,62±10,18	2,52±1,35
5-Metileicosano	2052	0,75±1,36	0,54±1,07	0,67±1,39	1,30±2,11
Heneicosano	2100	1,05±0,57	2,44±3,10	1,74±1,99	0,90±0,64
9-Metilheneicosano	2146	2,06±1,90	3,37±6,55	6,86±9,28	13,00±17,61
3-Metilheneicosano	2172	28,47±20,16	40,44±27,97	26,14±18,61	25,70±22,18
Docosano	2200	0,51±0,40	1,41±2,75	0,25±0,40	0,38±0,88
X-Tricoseno	2281	0,33±0,68	0,18±0,36	0,22±0,45	0,10±0,27
Y-Tricoseno	2286	0,11±0,25	0,69±0,16	0,81±0,17	0,19±0,37
Tricosano	2300	3,16±2,07	3,06±2,72	2,15±1,63	2,66±2,31
9-Metiltricosano	2331	0,44±0,56	0,33±0,35	0,23±0,29	0,45±0,11
7-Metiltricosano	2338	Tr	0,13±0,27	Tr	-
5-Metiltricosano	2350	-	Tr	-	-
X-Metiltricosano	2358	0,99±1,79	0,75±1,50	0,91±1,86	1,68±2,72
3-Metiltricosano	2373	Tr	Tr	Tr	Tr
Tetracosano	2400	0,33±0,40	0,32±0,74	0,18±0,32	Tr
12-Metiltetracosano	2437	Tr	Tr	Tr	0,17±0,32
Pentacosano	2500	1,91±1,42	2,02±2,07	1,17±1,10	1,11±0,86
13-Metilpentacosano	2538	0,37±0,43	0,29±0,30	0,27±0,22	0,25±0,26
5-Metilpentacosano	2555	1,83±3,55	0,73±0,95	0,61±1,03	0,28±0,40
9,13- Dimetilpentacosano	2565	0,38±0,66	-	Tr	Tr
3- Metilpentacosano	2567	0,35±0,65	0,26±0,51	0,31±0,64	0,60±0,96
5,9- Dimetilpentacosano	2584	Tr	Tr	Tr	0,16±0,30
Hexacosano	2600	0,26±0,26	0,18±0,38	0,10±0,24	Tr
3,8- Dimethylhexacosane	2608	Tr	Tr	-	-
2- Metilhexacosano	2658	0,99±1,84	0,74±1,50	0,90±1,86	1,66±2,73
X- Metilheptacosano	2712	5,11±6,53	2,04±1,76	2,98±4,23	1,90±1,98
Y- Metilheptacosano	2716	0,32±0,55	-	Tr	Tr
Y- Metilheptacosano	2719	0,40±0,74	0,29±0,57	0,35±0,72	0,65±1,07
7-Metilheptacosano	2738	Tr	Tr	Tr	0,31±0,59
5- Metilheptacosano	2745	Tr	-	-	-
3-Metilheptacosano	2778	4,73±5,59	4,71±3,92	4,08±2,93	5,13±5,12
X,Y- Dimetilheptacosano	2786	Tr	Tr	-	-

Heptacoseno	2794	0,37±0,92	0,66±1,35	0,84±1,75	1,11±2,42
Octacosane	2800	0,50±1,50	-	-	0,41±1,30
3, 11- Dimetilheptacosano	2807	9,27±0,0002	-	-	-
14-Metiloctacosano	2834	0,27±0,55	0,52±0,57	0,74±1,44	1,23±2,40
X-Metiloctacosano	2847	0,53±0,71	0,26±0,53	0,33±0,64	0,62±1,01
2-Metiloctacosano	2859	Tr	0,10±0,12	Tr	0,12±0,17
3-Metiloctacosano	2873	Tr	Tr	0,38±1,10	0,11±0,21
4,8- Dimetiloctacosano	2894	Tr	0,25±0,46	Tr	Tr
Nonacosano	2900	5,68±3,54	3,16±2,46	3,56±3,11	3,21±2,61
13-metilnonacosano	2937	2,41±1,30	2,10±1,56	2,01±1,39	2,57±1,85
7-Metilnonacosano	2942	0,15±0,22	0,23±0,29	0,13±0,23	Tr
5-Metilnonacosano	2951	Tr	Tr	Tr	-
9,15-Dimetilnonacosano	2953	-	-	-	0,11±0,19
7,11 Dimetilnonacosano	2961	Tr	0,10±0,20	Tr	Tr
X-Metilnonacosano	2968	Tr	-	Tr	Tr
3-Metilnonacosano	2975	4,64±2,97	2,19±2,69	2,45±2,47	3,33±2,47
Triacotano	3000	0,16±0,33	0,22±0,39	0,29±0,53	0,46±0,49
14-Metiltriacontano	3035	Tr	Tr	0,40±1,17	Tr
2-Metiltriacontano	3063	-	Tr	-	-
3-Metiltriacontano	3074	0,30±0,53	0,27±0,56	0,34±0,76	0,72±1,26
Hentriacontano	3100	0,68±0,46	0,46±0,62	0,55±0,44	0,44±0,46
11-Metilhentriacontano	3133	7,11±6,20	3,09±4,36	1,91±3,31	0,95±1,40
7-Metilhentriacontano	3142	0,12±0,24	0,23±0,46	0,23±0,43	Tr
5- Metilhentriacontano	3154	0,22±0,44	0,21±0,38	0,43±0,74	0,37±0,48
11,19- Dimetilhentriacontano	3160	Tr	Tr	0,13±0,32	Tr
X-Metilhentriacontano	3168	3,16±4,16	2,02±3,89	2,11±3,73	0,80±1,30
3-Metilhentriacontano	3175	0,23±0,33	2,97±2,63	2,17±3,31	1,71±1,63
Dotriacontano	3200	Tr	0,16±0,32	0,18±0,44	Tr
3,7-Dimetilhentriacontano	3210	Tr	0,12±0,27	0,18±0,42	0,36±0,67
14-Metildotriacontano	3233	0,16±0,33	0,18±0,34	0,18±0,44	Tr
8-Metildocotriacontano	3245	0,11±0,21	Tr	Tr	0,19±0,33
Tritriacontano	3300	-	Tr	-	-
13-Metiltritriacontano	3333	0,67±1,31	0,28±0,51	Tr	0,32±0,49
X-Metiltritriacontano	3335	0,18±0,54	0,16±0,34	0,41±0,94	Tr
7-Metiltritriacontano	3345	Tr	Tr	Tr	0,12±0,21
9,21-dimetiltritriacontano	3364	0,18±1,59	0,82±1,57	0,82±1,52	0,42±0,55
Tetatriacontano	3400	-	Tr	-	-
X-metiltetatriacontano	3424	-	-	-	Tr
14-Metiltetatriacontano	3435	Tr	-	Tr	-
2-Metiltetatriacontano	3454	Tr	Tr	-	Tr
Pentatriacontano	3500	-	Tr	-	Tr
1,21Dimetilpentatriacontano	3561	0,11±0,28	Tr	Tr	Tr

DP = Desvio padrão

ND= Não indentificado

***Tr= Traço (<0,1%)**

*compostos identificados nas amostras COM abundância relativa igual ou inferior a 0,1%

Tabela 3. Compostos que apresentaram valores estatisticamente significativos com destaque nos 10 mais significativos para a separação dos diferentes instares larvais que receberam tratamento com HJ e controle da espécie *Mischocyttarus consimilis* analisados por CG-EM.

Compostos	Índice calculado	Raiz 1	Raiz 2
*Pentadecano	1500	4,326	2,681
*Desconhecido	1660	5,714	2,225
*Octadecano	1800	-7,544	-3,987
Nonadecano	1900	-0,139	-2,155
*Desconhecido	1927	7,163	0,852
Desconhecido	1931	1,843	1,897
Desconhecido	1962	2,456	-2,581
Desconhecido	1970	1,112	-0,186
*3-Metilheicosano	2172	4,252	-4,596
Desconhecido	2186	0,639	0,106
Docosane	2200	2,644	-1,69
Desconhecido	2278	1,239	0,119
Desconhecido	2498	-0,853	1,705
*Pentacosano	2500	4,773	-4,462
*9,13- Dimetilpentacosano	2565	-10,278	22,035
*Y- Metilheptacosano	2716	7,663	21,325
*7-Metilheptacosano	2738	-4,211	-3,579
*Nonacosane	2900	-6,282	-2,396
9,15-Dimetilnonacosano	2953	0,600	2,764
Desconhecido	3139	-0,592	1,205
5-Metilhentriacontano	3154	2,421	-1,727
3-Metiltriacontano	3074	2,072	1,768
X-Metilhentriacontano	3168	1,416	2,521

*** 10 compostos mais significativos para separação dos grupos**

Tabela 4. Matriz das diferenças médias dos pares analisados pela ANCOVA da diferenciação facial dos grupos tratados com HJ nos 3^o, 4^o e 5^o instares larvais, grupo controle e rainhas de *Mischocyttarus consimilis*.

	Valor de p=	Valor de F=
Controle x 3^o Instar	0,025	6017
Controle x 4^o Instar	0,139	2395
Controle x 5^o Instar	0,102	3008
Controle x Rainha	0,040	5105
Rainha x 3^o Instar	0,077	3694
Rainha x 4^o Instar	0,039	5175
Rainha x 5^o Instar	0,023	6035
3^o Instar x 4^o Instar	0,448	606
3^o Instar x 5^o Instar	0,576	325
4^o Instar x 5^o Instar	0,859	220
Todos os grupos	0,002	3159

Referências Bibliográficas

Antonialli-Junior WF and Cruz-Landim C (2006). Effect of topical application of juvenile hormone on the occurrence of cell death in the larvae of honeybee (*Apis mellifera*). Brazilian Journal of Morphological Sciences 23: 377-383.

Antonialli-Junior WF, Lima SM, Andrade LHC and Suarez YR (2007). Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizzotoi* (Hymenoptera: Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. Genetics and Molecular Research 6: 492-499.

Antonialli-Junior WF, Cruz-Landim C (2009). Efeitos da aplicação tópica de hormônio juvenil sobre o desenvolvimento dos ovários de larvas de operárias de *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera, Apidae). Revista Brasileira de entomologia 53 (1): 115-120.

Arnold G, Quenet B, Cornuet JM, Masson C, de Schepper B, Estoup A and Gasqui P (1996). Kin recognition in honeybees. Nature 379: 498.

Baracchi D, Petrocelli I, Chittka L, Ricciardi G and Turillazzi S (2015). Speed and accuracy in nest-mate recognition: a hover wasp prioritizes face recognition over colony odour cues to minimize intrusion by outsiders. Proceedings of the Royal Society B 282: 20142750.

Cnaani J, Borst DW, Huang ZY, Robinson GE and Hefetz A (1997). Caste determination in *Bombus terrestris*: differences in development and rates of JH biosynthesis between queen and worker larvae. Journal Insect Physiology 43: 373-381.

Dani FR, Jones GR, Corsi S, Beard R, Pradella D and Turillazi S. (2005). Nest mate recognition cues in the honey bees: Differential importance of cuticular n-alkanes and alkenes. *Chemical Senses* 30:1–13.

D'Ettorre P, Heinze J, Schulz C, Francke W, Ayasse M (2004). Does she smell like a queen? Chemoreception of a cuticular hydrocarbon signal in the ant *Pachycondyla inversa*. *Journal of Experimental Biology* 207: 1085-1091.

de Souza AR, Júnior CAM, do Nascimento FS and Lino-Neto J (2014). Sexy faces in a male paper wasp. *PLoS One* 9(5): e98172.

Dyar HV (1890). The number of molts of lepidopterous larvae. *Psyche* 5: 420-422.

Eickwort K (1969). Separation of the caste of *Polistes exclamans* and notes on its biology (Hymenoptera: Vespidae). *Insectes Sociaux* 16: 67–72.

Endler A, Liebig J and Hölldobler B (2006). Queen fertility, egg marking and colony size in the ant *Camponotus floridanus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 59: 490-499.

Gadagkar R, Bhagavan S, Malpe R and Vinutha C (1990). On reconfirming the evidence for pre-imaginal caste bias in a primitively eusocial wasp. *Proceedings of the Indian Academy of Science B* 99: 141-150.

Giannotti E (1998). The colony cycle of the social wasp, *Mischocyttarus cerberus styx* Richards, 1940 (Hymenoptera: Vespidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 41: 217-224.

Gibbs AG (2002). Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *Journal Insect Physiology* 48: 391-400.

Giray T, Giovanetti M and West-Eberhard MJ (2005). Juvenile hormone, reproduction, and worker behavior in the neotropical social wasp *Polistes canadensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 3330-3335.

Gullan PJ and Cranston, PS (2012). *Os insetos: um resumo de entomologia*. 4ed. São Paulo: Roca. 480p.

Heinze J, Stengl B and Sledge MF (2002). Worker rank, reproductive status and cuticular hydrocarbon signature in the ant, *Pachycondyla cf. inversa*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52: 59-65.

Howard RW and Blomquist GJ (2005). Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology* 50: 371-393.

Izzo A, Wells M, Huang Z and Tibbetts E (2010). Cuticular hydrocarbons correlate with fertility, not dominance, in a paper wasp, *Polistes dominulus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64: 857-864.

Jeanne RL (1972). Social biology of the neotropical wasp *Mischocyttarus drewseni*. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*. 144:63-150

Judd TM, Magnus RM and Fasnacht MP (2010). A nutritional profile of the social wasp *Polistes metricus*: differences in nutrient levels between castes and changes within castes during the annual life cycle. *Journal of Insect Physiology* 56: 42–56.

- Karsai I and Hunt JH (2002). Food quantity affects traits of offspring in a paper wasp, *Polistes metricus* (Hymenoptera, Vespidae) *Ecological Entomology*, Londres 31: 99-106.
- Kather R, Drijfhout FP and Martin SJ (2011). Task group differences in cuticular lipids in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Chemical Ecology* 37: 205-212.
- Keeping MG. 2002. Reproductive and worker castes in the primitively eusocial wasp *Belonogaster petiolata* (DeGeer) (Hymenoptera: Vespidae): Evidence for pre-imaginal differentiation. *Journal of Insect Physiology* 48: 867- 879.
- Laidlaw HH (1992). In: The Hive and the Honey Bee. Graham. J. M. editor. Hamilton, IL: Dadant 989–1042.
- Lengyel F, Westerlund SA and Kaib M (2007). Juvenile hormone III influences task-specific cuticular hydrocarbon profile changes in the ant *Myrmicaria eumenoides*. *Journal of Chemical Ecology* 33: 167-181.
- Lorenzi, MC, Sledge, MF, Laiolo P, Sturlini E and Turillazzi S (2004). Cuticular hydrocarbon dynamics in young adult *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae) and the role of linear hydrocarbons in nestmate recognition systems. *Journal of Insect Physiology* 50: 935-941.
- Mead, F., Gabouriaut, D. 1993. Post-eclosion sensitivity to social context in *Polistes dominulus* Christ females (Hymenoptera, Vespidae). *Insectes Sociaux* 40: 11-20.
- Michaelian, K. H. 2003. Photoacoustic Infrared Spectroscopy. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.
- Mitra A, Ravindra PN, Arathy R and Gadagkar R (2014). Nestmate discrimination in the social wasp *Ropalidia marginata*: chemical cues and chemosensory mechanism. *Animal Behaviour* 88 (2014) 113-124.
- Mitra A, Ravindra PN, Arathy R, Paromita S and Gadagkar R (2015). Males and females of the social wasp *Ropalidia marginata* do not differ in their cuticular hydrocarbon profiles and do not seem to use any long distance volatile mate attraction cues. *Insectes Sociaux*. 62: 281-289.
- Monnin T (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Annales Zoologici Fennici*. 43:515-530.
- Montagna TS, Raizer J, Antonialli-Junior WF (2015). Effect of Larval Topical Application of Juvenile Hormone on Caste Determination in the Independent-Founding Eusocial Wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Open Journal of Animal Sciences* 5: 174-184.
- Neves EF, Andrade LHC, Suárez YR, Lima SM and Antonialli-Junior WF (2012). Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genetics and Molecular Research* 11 (3): 1891-1898.

- Neves EF, Montagna TS, Andrade LHC, Suárez YR, Lima SM and Antonialli-Junior WF (2013). Social parasitism and dynamics of cuticular hydrocarbons in paper wasp of the Genus *Mischocyttarus*. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 86: 69-77.
- Nijhout HF and Wheeler DE (1982). Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. *Quarterly Review of Biology* 57:109-133.
- Oi CA, Van Oystaeyen A, Oliveira RC, Millar JG, Verstrepen KJ, Van Zweden JS and Wenseleers T (2015). Dual Effect of Wasp Queen Pheromone in Regulating Insect Sociality. *Current Biology* 25(12):1638-40.
- Panek LM, Gamboa GJ, Espelie, KE (2001). The effect of a wasp's age on its cuticular hydrocarbon profile and its tolerance by nestmate and non-nestmate conspecifics (*Polistes fuscatus*, Hymenoptera: Vespidae). *Ethology* 107: 55-6.
- Park YI and Raina A (2003). Factors regulating caste differentiation in the *Formosan* subterranean termite with emphasis on soldier formation. *Sociobiology* 41: 1–12.
- Penick CA, Prager SS and Liebig J (2012). Juvenile Hormone Induces Queen Development in Late-Stage Larvae of the Ant *Harpegnathos saltator*. *Journal of Insect Physiology* 58: 1643-1649.
- Petrocelli I, Ricciardi G, Rodrigues, de Souza A, Ermanni A, Ninu A and Turillazzi S (2014). Visual signals of individual quality in a European solitary founding paper wasp. *Ethology* 121(3): 300–307.
- Quinn GP and Keough MJ (2005). *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Robinson GE and Vargo EL (1997). Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 35: 559-583.
- Ross KG and Matthews RW.(editors). 1991. *The social biology of wasps*. Cornell University Press. xii+ 678p.
- Rossi AM and Hunt JH (1988). Honey supplementation and its development consequences: Evidence for food limitation for paper wasp, *Polistes metricus*. *Ecological Entomology* 13: 437-442.
- Shorter J and Tibbetts E (2009). The effect of juvenile hormone on temporal polyethism in the paper wasp *Polistes dominulus*. *Insectes sociaux*, 56(1):7-13.
- Singer TL, Espelie KE and Gamboa GJ (1998). Nest and nestmate discrimination in -founding wasps. In: Vander Meer RK, Breed MD, Winston ML and Espelie EK. editors. *Pheromone communication in social insects* 104-125. Boulder, Westview Press.
- Sledge MF, Boscaro F and Turillazzi S (2001). Cuticular hydrocarbons and reproductive status in the social wasp *Polistes dominulus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 49: 401-409.

Sledge MF, Trinca I, Massolo A, Boscaro F and Turillazzi (2004). Variation in cuticular hydrocarbon signatures, hormonal correlates and establishment of reproductive dominance in a polistine wasp. *Journal of Insect Physiology* 50: 73–83.

Smith BC (1999). *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Solís CR and Strassmann JE (1990). Presence of brood affects caste differentiation in the social wasp, *Polistes exclamans* Viereck (Hymenoptera: Vespidae). *Functional Ecology* 4: 531-541.

Tannure-Nascimento IC, Nascimento FS and Zucchi R (2008). The look of royalty: visual and odour signals of reproductive status in a paper wasp. *Proceedings of the Royal Society B*, 11: 1-8.

Tannure-Nascimento IC, Nascimento FS, Turatti IC, Lopes NP, Trigo JR and Zucchi R (2007). Colony membership is reflected by variations in cuticular hydrocarbon profile in a Neotropical paper wasp, *Polistes satan* (Hymenoptera, Vespidae). *Genetics and Molecular Research*, 6: 390-396.

Tannure-Nascimento IC, Nascimento FS and Zucchi R (2008). The look of royalty: visual and odour signals of reproductive status in a paper wasp. *Proceedings of the Royal Society B* 11: 1-8.

Tibbetts E (2002). Visual signals of individual identity in the paper wasp *Polistes fuscatus*. *Proceedings Royal Society of London* 269: 1423-1428.

Tibbetts E and Dale J (2004). A socially enforced signal of quality in a paper wasp. *Nature* 432: 218-222.

Tibbetts EA and Huang ZY (2010). The challenge hypothesis in an insect: Juvenile hormone mediates reproductive conflict following queen loss in *Polistes* wasps. *American Naturalist* 176: 123-130.

Tofolo VC, Giannotti E, Neves EF, Andrade LHC, Lima SM, Suárez YR, Antonialli-Junior WF (2014). Polydomy in the ant *Ectatomma opaciventre*. *Journal of Insect Science*. 14 (21): 1-16.

Torres, V.O., Montagna, T.S., Fernandes, W.D., Antonialli-Junior, W.F. 2011. Colony cycle of the social wasp *Mischocyttarus consimilis* Zikán (Hymenoptera: Vespidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 55(2): 247-252.

Torres VO, Montagna TS, Raizer J and Antonialli-Junior WF (2012). Division of labor in colonies of the eusocial wasp *Mischocyttarus consimilis*. *Journal of Insect Science*. 12:2.

Wagner, D., M. Tissot., D. M. Gordon. 2001. Task related environment alters the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants. *Journal of Chemical Ecology* 27:1805-1819.

Weaver N (1966). Physiology of caste determination. *Annual Review of Entomology* 11: 79-102.

Zarbin PHG, Rodrigues MACM and Lima ER (2009). Feromônios de insetos: tecnologias e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. *Química Nova* 32: 722-731.

Capítulo II

**Efeito da aplicação tópica de Hormônio Juvenil em fêmeas recém
emergidas da vespa social *Mischocyttarus consimilis* (Vespidae:
Polistinae)**

Efeito da aplicação tópica de Hormônio Juvenil em fêmeas recém emergidas da vespa social *Mischocyttarus consimilis* (Vespidae: Polistinae)

Resumo: O Hormônio Juvenil atua em diversos aspectos da vida dos insetos sociais, afetando o grau de desenvolvimento ovariano de rainhas e polietismo temporal em operárias. Por conseguinte, também pode atuar na determinação de parte da composição química cuticular que diferencia as castas de rainhas e operárias. Entretanto, são poucos os estudos que já avaliaram a ação do HJ sobre a ontogenia comportamental, perfil químico cuticular e fisiologia do ovário. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do HJ sobre a ontogenia comportamental, fisiologia e compostos químicos cuticulares, quando sua aplicação é feita em operárias recém-emergidas de *Mischocyttarus consimilis*. Uma única aplicação de HJ foi feita em operárias recém-emergidas de 1 dia de vida na concentração de 25µg de HJ em 1µl de acetona. Os resultados mostram que há mudanças significativas na fisiologia das fêmeas, quanto ao comprimento dos ovócitos, o que as tornam mais agressivas, diminuem as taxas de forrageamento e, ainda têm sua composição química cuticular significativamente alterada.

PALAVRAS-CHAVE: Polietismo, fisiologia do ovário, perfil químico cuticular.

Introdução

A divisão reprodutiva de trabalho é uma das características marcantes dos insetos sociais, na qual uma fêmea é responsável pela manutenção no número de indivíduos por meio da reprodução, enquanto que o restante da colônia trabalha na manutenção dos recursos necessários ao sucesso do grupo, tais como alimentação, limpeza, cuidado com os imaturos e defesa da colônia (Wilson 1971).

Em espécies de fundação independente de insetos sociais, existem poucas ou nenhuma diferenciação morfológica entre rainhas e operárias (Robinson e Vargo 1997). Contudo as operárias não perdem a capacidade de se reproduzirem (Gadagkar et al., 1991). Porém as rainhas por serem mais agressivas acabam ingerindo maior quantidade de alimento e conseqüentemente acaba tendo um maior desenvolvimento ovariano, além de evitarem tarefas de alto risco e que despendam um custo energético elevado (Queller e Strassmann 1989; Röseler 1991; O'Donnell 1998; Torres et al., 2012).

Nos insetos sociais a divisão de trabalho é mediada, entre outros fatores pelo Hormônio Juvenil (HJ), que pode vir a afetar desde a fisiologia até o comportamento de rainhas e operárias (Robinson e Vargo 1997). Assim, o HJ é conhecido por modular a divisão de trabalho reprodutivo em vespas sociais como, por exemplo, em *Polistes* as altas taxas de HJ promove a formação de novas rainhas (Röseler et al., 1984; 1985). Já em *Polybia* o HJ é responsável pela produção de novas forrageadoras acelerando o polietismo temporal (O'Donnell e Jeanne 1993; O'Donnell 1998).

Em *Polistes canadensis* o HJ antecipa a execução da tarefa de guarda e aumenta o número de forrageadoras (Giray et al., 2005). Enquanto em *Ropalidia marginata* o HJ promoveu um maior desenvolvimento ovariano, sem entretanto, promover modificações quanto ao polietismo temporal (Agrahari e Gadagkar 2003), sugerindo que as modificações provenientes do HJ dependem também da fisiologia de cada indivíduo (Giray et al., 2005).

Outro aspecto importante na vida dos insetos sociais, e que parece estar intimamente relacionado com as taxas de HJ é a assinatura química cuticular, uma vez que se este hormônio pode alterar a fisiologia e comportamento, também deve alterar estes compostos que distinguem operárias de rainhas (Bonavita-Cougourdan et al., 1991; Sledge et al., 2001).

Esta relação entre HJ e os compostos químicos da cutícula é íntima porque estes compostos sinalizam o status reprodutivo, como já discutido em estudo com a vespa *Polistes dominula* (Sledge et al., 2001; 2004), as formigas *Dinoponera quadricaps* (Monnin et al., 1998) e *Myrmecia gulosa* (Dietemann et al., 2003). Operárias da

formiga *Lasius niger* ao perceberem o hidrocarboneto que sinaliza o potencial reprodutivo de sua rainha, se mantêm estéreis (Holman et al., 2010). Desta maneira os hidrocarbonetos cuticulares atuam como sinais de fertilidade indicando quais seriam as fêmeas com potencial reprodutivo e assim impedir a postura de outras fêmeas (Keller e Nonacs, 1993).

Em *Polistes dominula*, por exemplo, quando a fêmea dominante é removida, a fêmea que assume seu lugar acaba desenvolvendo um perfil similar ao da fundadora (Sledge et al., 2001 e Sledge et al., 2004). E em *Polistes metricus* as taxas de HJ da hemolinfa são determinadas pela alimentação diferencial na fase larval que é refletida nos compostos químicos cuticulares de recém-emergidos (Judd et al., 2010).

Portanto pode-se perceber que os hidrocarbonetos cuticulares são compostos dinâmicos que podem ser alterados tanto pelo papel quanto pelo ambiente desses insetos (Dapporto et al., 2005). Sendo assim este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do HJ sobre a ontogenia comportamental, fisiologia e compostos químicos cuticulares, quando sua aplicação é feita em operárias recém-emergidas de *Mischocyttarus consimilis*.

Hipóteses

A primeira hipótese desse trabalho é que haverá variação significativa na ontogenia comportamental de operárias quando receberem aplicação tópica de HJ logo que emergirem.

A segunda hipótese é que haverá mudanças significativas no comportamento, na composição química cuticular e na fisiologia de fêmeas que receberem aplicação tópica de HJ logo que emergirem.

Material e Métodos

Tratamentos e coleta dos indivíduos

Os estudos foram conduzidos a partir da manipulação experimental de 11 colônias, e um total de 98 fêmeas na fase de produção de operárias, da vespa eussocial *Mischocyttarus consimilis* em condições naturais, estabelecidas em áreas rurais no município de Dourados- MS (22°13'16" S, 54°48'20" W).

Fêmeas recém-emergidas com um dia de vida foram submetidas aos seguintes procedimentos: operárias com aplicação de HJ (tratamento); operárias com aplicação de acetona (controle 1), e operárias sem nenhum tipo de aplicação (controle 2). As fêmeas

que receberam o tratamento com HJ foram submetidas a uma única aplicação de 1µl de HJ na concentração de 25µg de HJ em 1µl de acetona seguindo metodologia proposta por Giray et al., (2005), uma vez que, segundo Neves et al., (2012), nesta idade, esta espécie ainda não adquiriram a assinatura colonial. Já as Fêmeas que receberam aplicação somente do solvente, foram submetidas a uma única aplicação de 1µl de acetona.

Foi avaliada a taxa de morte/ desaparecimento após aplicação de cada um dos tratamentos. Em seguida, fêmeas tratadas com HJ e solvente, bem como aquelas de mesma idade sem nenhum tratamento (controle 2) foram marcadas com tinta atóxica na perna direita, permitindo assim sua identificação, bem como dos comportamentos por elas executados. As fêmeas marcadas foram monitoradas durante 12 dias, sendo 4 horas por dia (9:00-11:00 e das 14:00-16:00) de setembro de 2013 a setembro de 2015. Quando havia mais de uma fêmea marcada no ninho, eram feitos rodízios de observações com 5 minutos por indivíduo, durante os períodos de observações.

De todas as fêmeas marcadas foram avaliadas os repertórios comportamentais pelo método de todas as ocorrências (“ad libitum” sensu Altmann, 1974), uma vez que com 12 dias as operárias desta espécie já desenvolveram todos os comportamentos intra e extra nidais da ontogenia de seu repertório comportamental como descrito por Torres et al., (2011), do qual foram compilados, como parâmetros os atos envolvidos no repertório de operárias. Portanto, foi avaliado mudanças na frequência, durante a ontogenia comportamental entre os diferentes tratamentos como proposto por Giray et al., (2005).

O repertório comportamental das fêmeas foi analisado de acordo com Torres et al., 2012, e agrupados em dois grupos de idades, sendo de 1 a 5 dias consideradas fêmeas jovens que executavam trabalhos em sua maioria intranidais e o grupo de 6 a 12 dias foram consideradas fêmeas velhas, que executavam trabalhos extra nidais com maior frequência. Já os comportamentos foram agrupados em sete categorias sendo: 1- Atos agressivos (cabeçada dada, cabeçada recebida, disputar alimento e solicitar alimento); 2-Trofalax (Trofalax adulto-adulto e trofalax larva-adulto); 3- Verificar células; 4-Auto-limpeza corporal; 5-Inatividade (Permanecer imóvel); 6-Forragear (Forragear néctar, água, polpa de madeira; forrageamento mal sucedido); 7-Outros (limpar células, receber reconhecimento, reconhecer indivíduos, bater a perna no ninho, vibrar asas e andar sobre o ninho).

Para avaliar estatisticamente o efeito da aplicação dos tratamentos, em relação ao controle sobre a ontogenia comportamental de fêmeas jovens e mais velhas foi

aplicado sobre as frequências relativas de execução de cada tarefa um teste não paramétrico Qui- quadrado (X^2) com intervalo de confiança com nível de significância de $p < 0,05$ (Siegel e Castellan-Junior, 2006).

O mesmo teste foi aplicado para avaliar se há diferenças significativas entre o efeito dos tratamentos e controle sobre as frequências relativas com que as fêmeas realizam os comportamentos de agressividade, típico de dominantes e forrageio típico de operárias (Torres et al., 2012). Para realização da análise estatística, as frequências de forrageio e agressividade das fêmeas de todos os grupos analisados, foi realizada em conjunto com todas as idades, uma vez que a frequência de forrageamento é maior em fêmeas mais velhas, por isso, verificar as taxas de forrageio em fêmeas mais novas separadamente não seria possível por apresentarem frequências muito baixas.

Análise do grau de desenvolvimento ovariano de fêmeas sob efeito dos diferentes tratamentos

Todas as fêmeas marcadas e monitoradas após 12 dias de vida foram coletadas para análise dos seus perfis de seus compostos químicos cuticulares e do grau de desenvolvimento ovariano. Ao total foram 32 fêmeas coletadas.

Para análise do desenvolvimento ovariano foi extraído o gáster de cada uma das 32 operárias coletadas, em seguida, dissecados em uma placa de petri contendo solução fisiológica. De cada fêmea foi obtido o comprimento médio dos seis maiores ovócitos e essa medida foi utilizada como índice de desenvolvimento ovariano individual (Giray et al., 2005). O comprimento dos ovócitos foi obtido com auxílio de um Estereomicroscópio Zeiss Stemi 2000C adaptado com uma ocular micrométrica (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany).

Os valores obtidos dos graus de desenvolvimento dos ovários de fêmeas submetidas aos diferentes tratamentos foram comparados por Análise de Variância (ANOVA), e utilizou-se a função logarítmica para homogeneizar a variância dos dados (Bussab e Morrettin 2002). Para analisar as diferenças entre os grupos foi aplicado um teste a priori de Tukey (Hair et al., 2009).

Análise do efeito da aplicação tópica de HJ sobre a química cuticular por FTIR-PAS

Para análise da variação dos compostos químicos cuticulares foi utilizada a técnica não ser destrutiva de Espectroscopia Óptica por Transformada de Fourier no Infravermelho Médio por Detecção Fotoacústica (*Fourier Transform Infrared*

Photoacoustic Spectroscopy- FTIR-PAS). Esta técnica vem sendo usada com sucesso, quando se pretende avaliar se há diferenças entre grupos, sem pretensão de se avaliar quais são as diferenças, já aplicadas em estudo com formigas e vespas sociais (Tofolo et al., 2014; Neves et al., 2012; 2013).

Esta técnica é mais rápida e barata do que a usual, cromatografia gasosa, e permite a análise de ambas as propriedades térmicas e ópticas dos materiais (Michaelian 2003). Outra vantagem desta técnica é que a necessidade de preparação da amostra é mínima, além da capacidade de ler materiais opacos e sólidos, e não é destrutiva (Michaelian 2003), e por isto pode ser utilizada para obter de forma ágil, resultados confiáveis. Uma vez que a intenção não foi descrever os compostos responsáveis pelas diferenças encontradas, as leituras foram feitas de forma padronizada no tórax. Estas amostras foram colocadas previamente em estufa a vácuo por 48 horas para minimizar a absorção de umidade, a qual pode interferir no espectro. Neste estudo, a espectroscopia fotoacústica de infravermelhos foi usada para ler a radiação absorvida pela amostra do infravermelho médio a região, compreendendo a faixa espectral de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Esta região é sensível às vibrações de grupos químicos moleculares, o que permite a identificação de radicais moleculares e tipos de ligações químicas nas amostras (Smith, 1999). Durante a leitura, o sistema foi purgado com ar seco para remover partículas, vapor de água e CO_2 , e a câmara fotoacústica acoplado ao microfone foi purgada com gás hélio para aumentar a sensibilidade. Para cada amostra, foi obtido um espectro médio de 64 varreduras com uma resolução de 8 cm^{-1} .

As possíveis diferenças entre a composição química da cutícula dos grupos de fêmeas controles, fêmeas que receberam aplicação de HJ e fêmeas que receberam aplicação de acetona foram avaliadas em intensidade dos picos dos espectros médios, pela análise de função discriminante (Quinn e Keough, 2005).

Análise do efeito da aplicação tópica de HJ sobre a química cuticular por Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa foi usada para refinar as análises e determinar a variação quali e quantitativa dos compostos. As mesmas amostras utilizadas na técnica de FTIR-PAS foram avaliadas pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM). Cada amostra foi imersa em um vidro de penicilina composto por $2000 \mu\text{L}$ de hexano durante 2 minutos. Posteriormente o soluto, resultante da extração, foi submetido à secagem, com o auxílio de capela e posteriormente

congelados por no máximo 30 dias. Para as análises cromatográficas cada extrato foi dissolvido em 50 µL de hexano.

Para análise dos compostos cuticulares de cada amostra foi empregado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM). As condições de análises foram testadas com as amostras reais. Para obter uma melhor separação cromatográfica foram avaliados parâmetros como vazão, fase estacionária e temperaturas do detector, forno e injetor.

Para identificação dos compostos analisados foram empregados os índices de retenção calculados empregando uma série de alcanos lineares, a biblioteca do equipamento, espectros de massas, e padrões de alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos empregados para auxiliar na identificação dos compostos. Também foi feita a identificação de compostos que não dispomos de padrões, por meio da interpretação dos espectros de massas associados a ferramentas acima descritas.

As amostras foram analisadas por meio do cromatógrafo gasoso (GC-2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector de massas (GC-MS Ultra 2010, Shimadzu, Kyoto, Japan), usando uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J & W, Folsom, California) 5% de fenil-dimetilpolisiloxano em sílica fundida capilar (30 m de comprimento x 0.25 mm de diâmetro x 0.25 µm de espessura). As condições de análise foram: gás carregador de hélio (99.999% e velocidade de fluxo de 1.0 mL min⁻¹); volume de injeção de 1 µL, modo de injeção splitless. Rampa de aquecimento com temperatura inicial de 150 °C alcançando 300°C à 3°C min⁻¹ e permanecendo na temperatura final por 10 minutos. Temperatura do injetor de 220°C. As temperaturas do detector e da linha de transferência foram de 250°C e 200°C respectivamente. Os parâmetros de varredura do EM incluíram voltagem de ionização de impacto de elétron de 70 eV, uma faixa de massa de 45 a 600 m/z e um intervalo de varredura de 0.3 s.

Para identificação dos compostos analisados foram empregados os índices de retenção calculados empregando uma série de alcanos lineares, a biblioteca do equipamento, espectros de massas, e padrões de alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos empregados para auxiliar na identificação dos compostos. Também foi feita a identificação de compostos que não dispomos de padrões, por meio da interpretação dos espectros de massas associados a ferramentas acima descritas.

As possíveis diferenças entre a composição química da cutícula das fêmeas submetidas aos diferentes tratamentos foram avaliadas em relação ao percentual de área relativa dos picos dos cromatogramas, pela análise de função discriminante (Quinn e Keough, 2005).

Resultados

Análise do efeito da aplicação tópica de HJ sobre o comportamento e fisiologia do ovário

Das 98 fêmeas tratadas (35 com HJ; 35 com Acetona; 28 controles) foram coletadas ao total 32 fêmeas (11 com HJ; 10 com Acetona; 11 controles), o que corresponde a uma taxa de mortalidade/ ou desaparecimento de 71% das fêmeas tratadas com HJ, 68,5% das fêmeas tratadas com Acetona e 60,7% das fêmeas controles.

A análise estatística Qui-quadrado (X^2) mostrou que há diferenças significativas no repertório comportamento das fêmeas sob efeito dos diferentes tratamentos ($X^2=70,056$; $p=0,000$). Ao todo foram 7407 atos comportamentais quantificados.

A análise Qui-quadrado (X^2) mostrou que há diferenças significativas no repertório comportamental de fêmeas jovens ($X^2=63,559$; $p=0,000$) e das mais velhas ($X^2=54,132$; $p=0,000$) sob efeito dos diferentes tratamentos (Figura 1).

A mesma análise mostra que há diferenças significativas entre o comportamento de forrageio e agressividade das fêmeas ($X^2=35,521$; $p=0,000$) que receberam o tratamento, em detrimento do controle (Figura 1).

Análise de Variância (ANOVA) mostrou que há diferenças significativas entre os comprimentos dos ovócitos das fêmeas sobre o efeito dos diferentes tratamentos ($F=3953$ $P=0,03$) (Figura 2 e tabela 1).

Análise do efeito da aplicação tópica de HJ sobre a química cuticular por FTIR-PAS

Pela inspeção visual dos espectros médios é possível perceber diferenças dos perfis químicos cuticulares das fêmeas sob efeito dos diferentes tratamentos (Figura 3). Entretanto é possível perceber visualmente que os picos 13 (grupo funcional -N-H-) é mais intenso para o grupo de fêmeas controle e o pico 6 (grupo funcional -C-H₂) tem maior intensidade para o grupo de fêmeas que receberam tratamento com HJ.

A análise discriminante a partir dos valores de intensidades dos picos dos espectros médios demonstra que os perfis químicos cuticulares de fêmeas adultas que receberam aplicação de HJ, fêmeas tratadas com acetona e fêmeas controles são significativamente diferentes (Wilks'lambda =0.517 e $F=2.444$ $p=0.0257$) sendo que a 1ª raiz explica = 87% dos resultados e a 1ª raiz e 2ª raízes juntas explicam 100% dos resultados, sendo que dos 14 picos analisados (Figura 4 e Tabela 2), 4 picos foram

significativos para separação dos grupos tanto na primeira como na segunda raiz canônica (Figura 4), sendo 1157, 1542, 2931 e 3093 cm^{-1} (Tabela 2).

Análise do efeito da aplicação tópica de HJ sobre a química cuticular por Cromatografia Gasosa

Pela inspeção visual dos cromatogramas representativos é possível apontar diferenças dos perfis químicos cuticulares das fêmeas sob efeito dos diferentes tratamentos (Figura 5). É possível perceber visualmente que os picos 4 (3-Metilnonadecano), 6 (Desconhecido) e o pico 9 (3-Metilpentacosano) mais intensos para o grupo que recebeu tratamento com HJ.

A análise discriminante dos dados referentes as áreas percentuais dos compostos detectados nos cromatogramas (Figura 5) demonstra que os perfis químicos cuticulares das fêmeas sob efeito dos diferentes tratamentos são significativamente diferentes com Wilks'lambda = 0.000 e $F = 49.029$; $p = 0.000$ sendo que a 1ª raiz explica = 99% dos resultados e a 1ª raiz e 2ª raízes juntas explicam 100% dos resultados (Figura 6).

Foram detectados 48 picos e destes 36 foram identificados (Tabela 3). A análise estatística apontou 14 picos como significativos para separação dos grupos, com destaque a 10 mais significativos estatisticamente na (Figura 6 e Tabela 4).

Os resultados mostram que o teor de alcanos ramificados é maior que o de lineares em todos os grupos, e não foi encontrado nenhum alceno nas amostras analisadas (Figura 7).

Os compostos considerados majoritários presentes em todas as amostras foram os compostos: Desconhecido com índice 1875; Heptacosano; Nonacosano; 3-Metilnonacosano; Triacotano; 3-Metilheptacosano e o 13,17 Dimetilhentriacotano. Com exceção dos compostos Heptacosano e Triacotano em que os teores apareceram em maior concentração nas amostras do grupo controle, os demais compostos citados apareceram em maior concentração no grupo tratado com HJ juvenil quando comparados com os demais grupos (Tabela 3).

Já os compostos 2-Metilheneicosano; 5-Metilpentacosano; X,Y-Dimetilheptacosano e o composto Desconhecido com índice 3122 foram majoritários para o grupo controle (Tabela 3).

Além disso, alguns compostos ocorreram exclusivamente em um dos grupos como o composto Desconhecido com índice 2729 que ocorreu apenas no grupo controle. Já no grupo com aplicação de Hormônio juvenil apareceram exclusivamente os seguintes compostos; Desconhecido com índice 1753, o Nonadecano, Desconhecido com índice 3048 e o composto Desconhecido com índice 3416. Já o grupo com aplicação do solvente (acetona) apareceram exclusivamente os seguintes compostos; Desconhecido com índice 2678, 14-Metiloctacosano, 7-Metilnonacosano e o composto Desconhecido com índice 3085 (Tabela 3).

Discussão

Os resultados demonstram que a aplicação tópica de HJ em fêmeas recém emergidas modifica a sua fisiologia e consequentemente a ontogenia de seu repertório comportamental corroborando os resultados de Giray et al., (2005).

Quando as fêmeas recém emergidas sofrem aplicação de HJ seguem até o 3^o dia um padrão semelhante aquelas que não sofreram aplicação de nenhum tratamento, começando a forragear entre 4-5 dias (Figura 1). Contudo, logo após passam a evitar esta atividade, permanecendo mais no ninho (Figura 1). Ao contrário, aplicação de HJ em fêmeas jovens de *Apis mellifera* faz com que elas comecem a forragear mais cedo e continuem esta atividade até o resto de suas vidas (Robinson e Ratnieks 1987). Portanto o efeito da aplicação de HJ em operárias recém-emergidas de espécies consideradas menos derivadas diferem daquelas com nível mais alto de sociabilidade, como *Apis*.

Evitar o forrageio é uma postura típica de fêmeas dominantes que evitam executar tarefas de alto custo energético e maior risco (O'Donnell 1998; Torres et al., 2011; 2012). Montagna et al., (2015), aplicando HJ no estágio larval, percebeu que fêmeas que emergem de larvas sob seu efeito, alteram seu comportamento em relação aquelas controle, permanecendo mais no ninho. Estes resultados indicam que mesmo após a emergência um aumento dos níveis de HJ ainda afeta a fisiologia e, por consequência o comportamento das fêmeas.

Esta alteração do comportamento é um reflexo da alteração de sua fisiologia, uma vez que fêmeas com maior grau de desenvolvimento ovariano têm um maior nível hierárquico na colônia (O'Donnell 1998) e com isto forrageiam menos.

Outra consequência da alteração fisiológica é a maior agressividade demonstrada por estas fêmeas (Figura 1) que caracteriza, de fato, fêmeas de maior nível hierárquico. Fêmeas dominantes são mais agressivas, ficam mais no ninho e também solicitam mais

recursos. Neste contexto, ainda que as fêmeas sob efeito do HJ se tornaram mais agressivas, não houve aparente mudança com relação a frequência com que solicitam recursos por meio da trofalaxia (Figura 1).

Outro fato que deve ser avaliado é a porcentagem significativa de fêmeas que, após aplicação dos tratamentos desapareceram da colônia. Uma explicação provável é a morte por conta da manipulação, marcação e, mesmo por conta dos efeitos do solvente. Por outro lado, pode se questionar se a alteração em sua fisiologia e comportamento não poderia levá-las a serem menos tolerantes na presença da própria rainha ou o contrário, sendo, portanto, expulsas, uma vez que não se encaixaram no ranque hierárquico já estabelecido, ou ainda deixarem suas colônias para fundar sua própria. (Gianotti e Machado 1999; Zara e Balestieri 2000).

O perfil químico cuticular de fêmeas sob o efeito do HJ também foi significativamente alterado com relação ao controle. Estes resultados corroboram com estudos que mostram que estes compostos químicos cuticulares servem para sinalizar a posição e os tipos de tarefas exercidas pelas fêmeas em suas colônias (Sledge et al., 2004; Monnin et al., 1998). Resultados similares foram encontrados por Lengyel et al., (2007) com a formiga *Myrmicaria eumenoides* em que a aplicação tópica do HJ Juvenil modificou a assinatura química das operárias que realizavam trabalhos intra-nidais para um perfil de forrageadoras.

Tanto nos resultados da análise de FTIR-PAS, quanto do CG-EM, as análises apontam diferenças significativas, com seus gráficos de dispersão exibindo maior ou menor sobreposição (Figuras 4 e 6), mas ainda assim, mostrando que fêmeas sob efeito de HJ adquirem um perfil químico distinto daquelas controles, consequência provável das mudanças de sua fisiologia e comportamento.

Por outro lado, as diferenças quanto a maior sobreposição dos dados na Figura 4, comparada a análise por cromatografia, justifica-se pelo fato de que as técnicas avaliam aspectos diferentes do perfil químico, uma vez que o FTIR-PAS analisa os grupos funcionais de todos os compostos presentes na cutícula, enquanto que a CG-EM, apesar de avaliar as diferenças quali e quantitativa destes compostos, avaliou, neste caso, somente a composição dos hidrocarbonetos cuticulares.

De forma geral os metil ramificados foram a maioria dos compostos responsáveis pela separação dos grupos e os compostos de maior abundância nas amostras, concordando com outras análises dos compostos cuticulares das vespas sociais *Polistes dominula* (Bonavita-Cougourdan et al., 1991), *Polybia occidentalis* (Singer et al., 1998) e *Mischocyttarus cassununga* (Murakami et al., 2015), o que

reforça o fato de que os alcanos ramificados são os principais compostos responsáveis pela comunicação química, além de serem os principais candidatos a compostos que sinalizam a fertilidade em insetos sociais (Dani et al., 2001).

Os compostos majoritários compartilhados por todos os grupos de fêmeas apresentaram-se em maior concentração no grupo com aplicação de HJ Juvenil, com exceção dos compostos Heptacosano e Desconhecido com índice 3122, que ocorreram em maiores teores nas amostras do grupo controle. Dentre os compostos majoritários, o Nonacosano aparece como um dos compostos de maior abundância em rainhas de *Dolichovespula saxônica* no trabalho de (Van Zweden et al., 2013). O mesmo ocorrendo com o composto 3- Metilnonacosano em formigas do gênero *Lasius* (Holman et al., 2013).

Um dos compostos que apareceram exclusivamente no grupo com tratamento de HJ Juvenil foi o Nonadecano, encontrado também em outras espécies de vespas formigas e abelhas, porém não se sabe qual é a função deste composto (Singer, 1998; Fröhlich et al., 2000; Lengyel et al., 2007; Nunes et al., 2009).

Conclui-se, portanto, que a aplicação de HJ em fêmeas recém emergidas desta espécie altera significativamente a fisiologia das fêmeas, o que por consequência altera sua ontogenia comportamental e os compostos químicos cuticulares que sinalizam esta nova condição, levando à fêmea a ter maior potencial de dominância dentro da colônia, assim aceitamos as hipóteses propostas. Contudo, estes resultados são diferentes daqueles obtidos por estudos com espécies mais derivadas, nas quais o HJ não leva operárias a mudar sua fisiologia e consequentemente seu comportamento com relação a companheiras de ninhos.

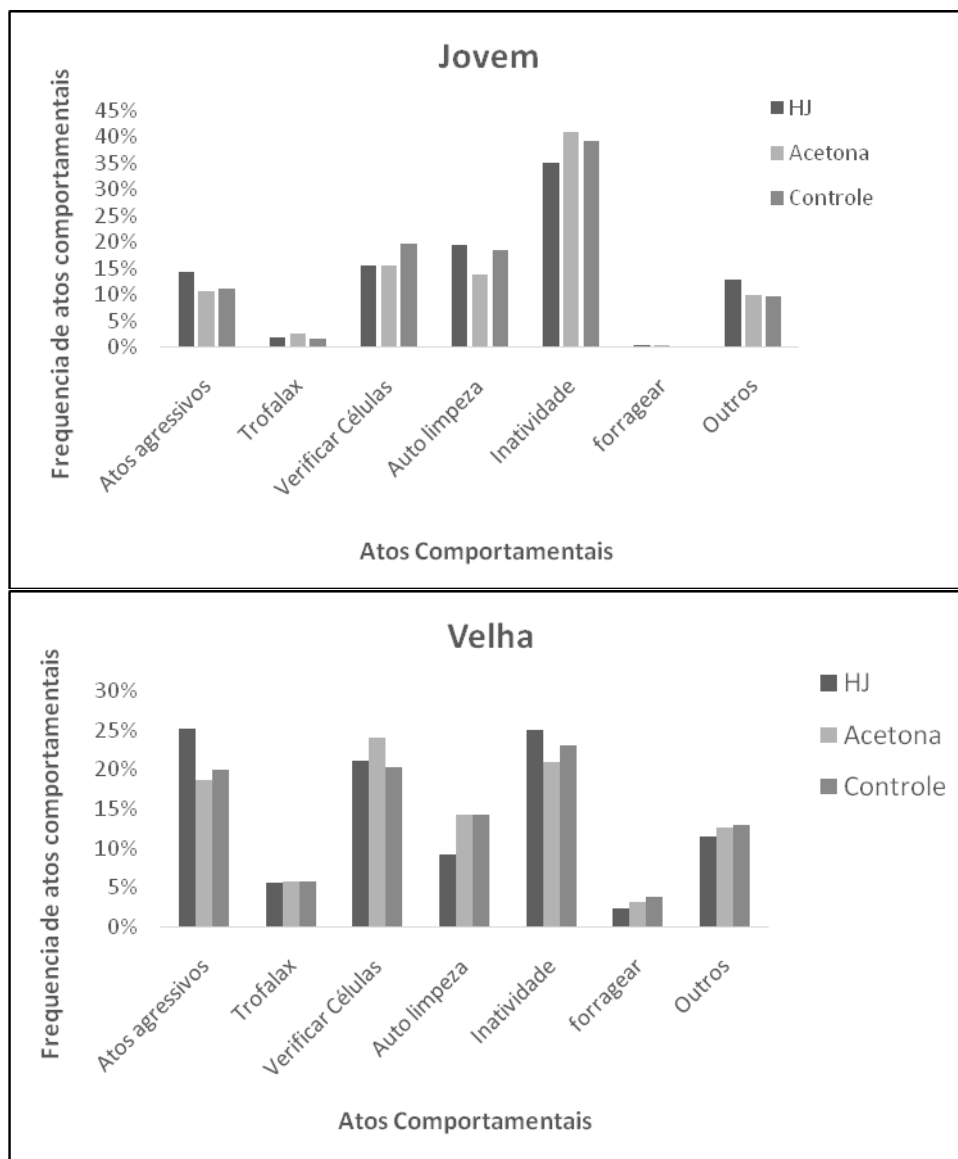


Figura 1. Frequência relativa dos atos comportamentais executados por fêmeas jovens e velhas de *M. consimilis* sob efeito dos diferentes tratamentos e controle.

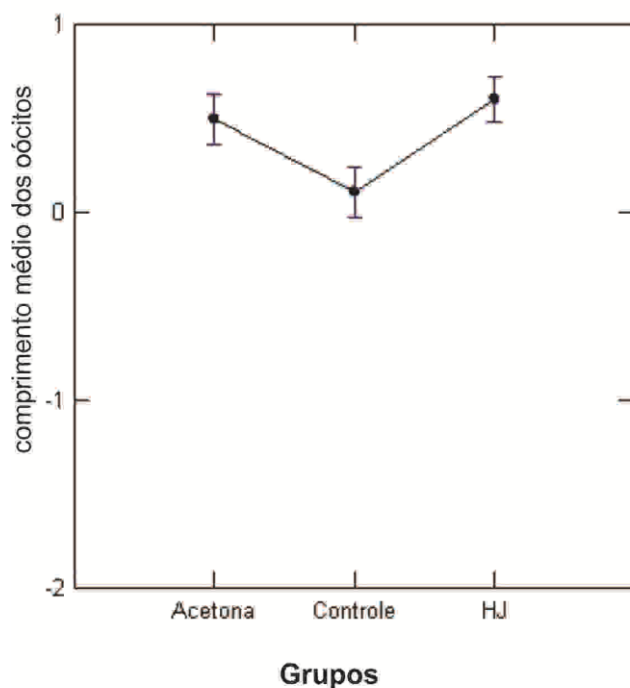


Figura 2. Comprimento médio dos ovócitos de fêmeas de *M. consimilis* sob efeito dos diferentes tratamentos e controle.

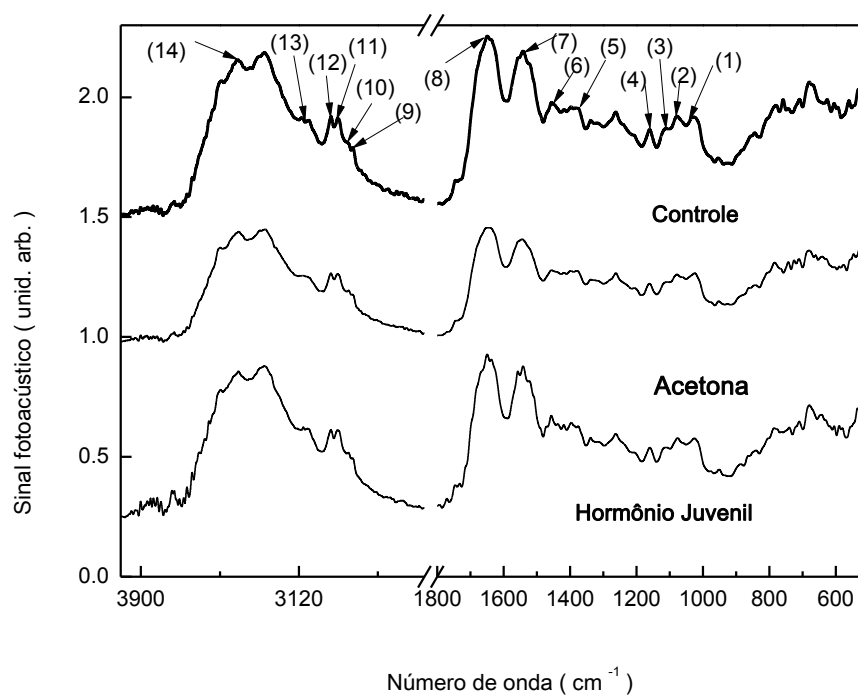


Figura 3. Curva média para cada grupo de espectros de absorção no infravermelho médio dos compostos cuticulares de fêmeas de *Mischocyttarus consimilis* sob efeito dos diferentes tratamentos e controle avaliados pela técnica de FTIR-PAS com indicação dos picos utilizados na análise estatística.

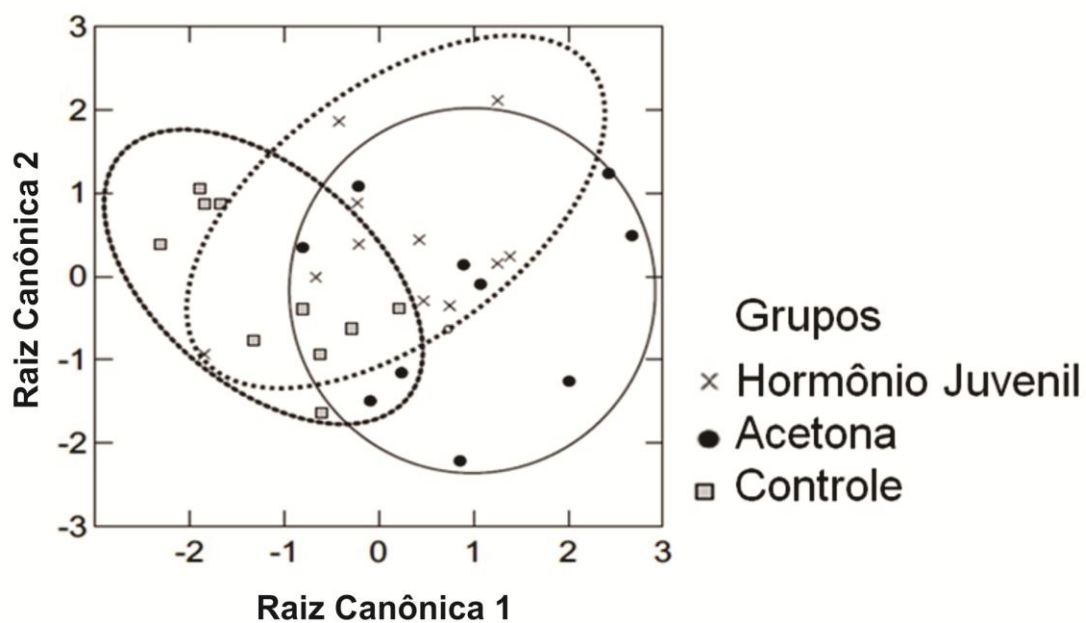


Figura 4. Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação em fêmeas de *Mischocyttarus consimilis* submetidas a aplicação de Hormônio Juvenil, acetona e o grupo controle analisados pela técnica de FTIR-PAS.

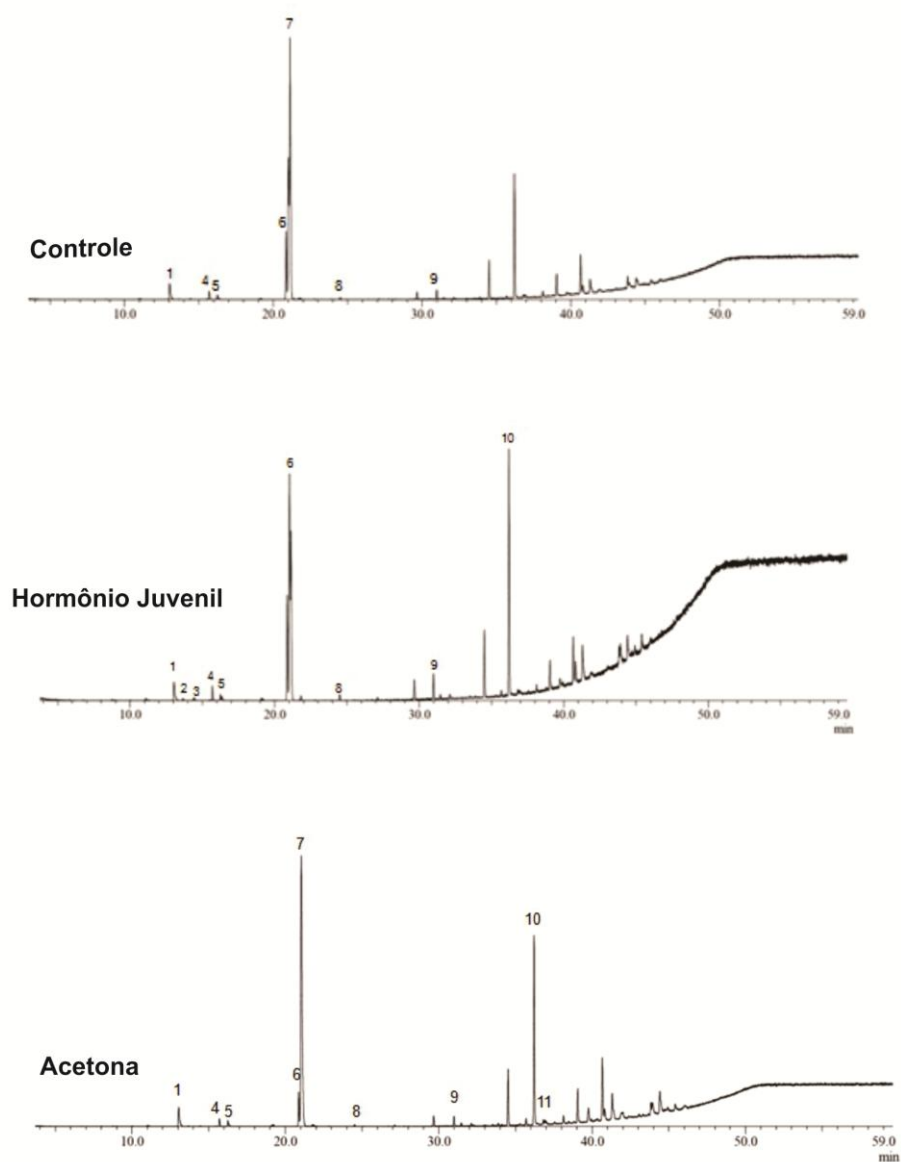


Figura 5. Cromatogramas representativos dos compostos cuticulares das fêmeas recém emergidas sob efeito dos diferentes tratamentos e controle com indicação dos 11 compostos que foram estatisticamente mais significativos para separação dos grupos* 1=Desconhecido; 2=Nonadecano; 3= X-Metilnonadecano; 4= 3-Metilnonadecano; 5= Desconhecido; 6= Desconhecido; 7= 2- Metilheneicosano; 8=Tricosano; 9= 3- Metilpentacosano; 10= 3- Metilheptacosano; 11= Octacosano

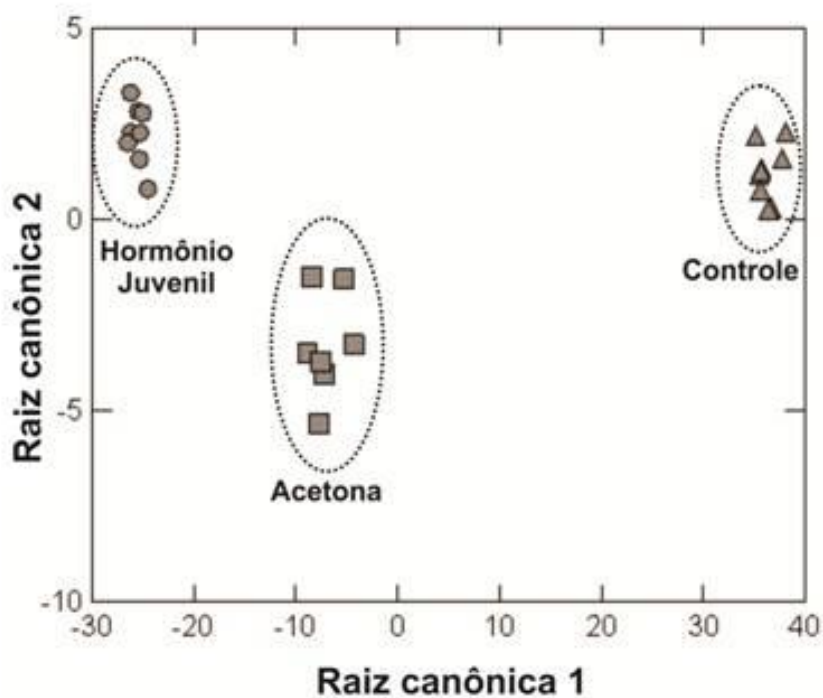


Figura 6. Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação em fêmeas de *Mischocyttarus consimilis* submetidas à aplicação de Hormônio Juvenil, acetona e o grupo controle analisados pela técnica de CG-EM.

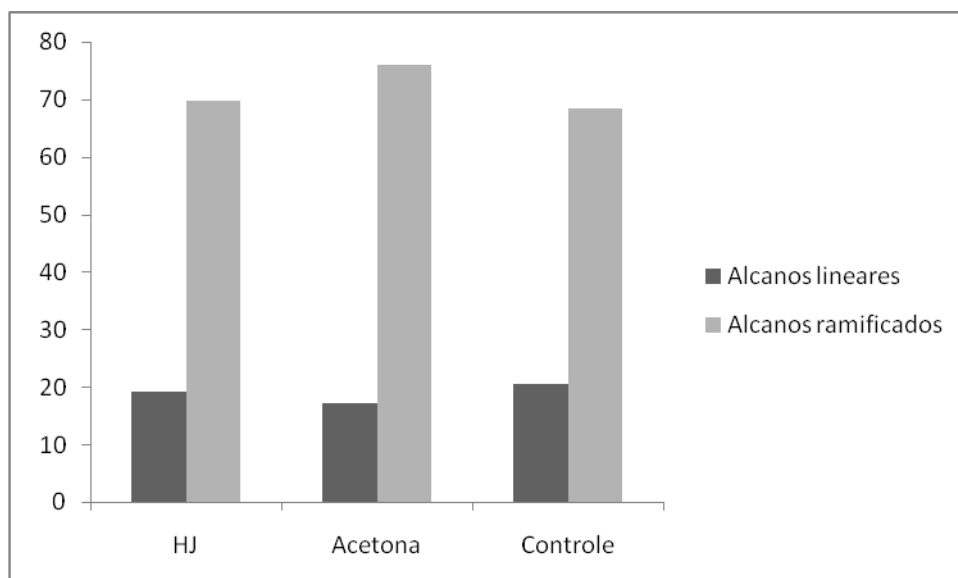


Figura 7. Abundância relativa em porcentagem dos compostos identificados na cutícula das fêmeas de *Mischocyttarus consimilis* sob efeito dos diferentes tratamento e controle por CG-EM.

Tabela 1. Matriz das diferenças médias dos pares analisados pelo teste de Tukey do comprimento médio dos ovócitos de fêmeas recém emergidas com aplicação de HJ, fêmeas tratadas com Acetona e grupo controle de *Mischocyttarus consimilis*

	Acetona	Controle	HJ
Acetona	-		
Controle	0.125	-	
HJ	0.826	0.030	-

Tabela 2. Número de onda, coeficientes das duas raízes canônicas, grupo funcional, e modo vibracional dos picos identificados nos espectros de absorção no infravermelho médio da cutícula das fêmeas de *M. consimilis* sob efeito dos diferentes tratamentos e controle por FTIR-PAS.

Pico	Número de onda (cm ⁻¹)	1ª Raiz Canônica	2ª Raiz Canônica	Grupo Funcional	Modo de Vibração
(1)	1041	-	-	C-H	Dobramento no plano
(2)	1079	-	-	C-H	Balanço no plano
(3)	1110	-	-	C-H	Balanço no plano
(4)	1157	1,892	1,845	C-H	Balanço no plano
(5)	1373	-	-	C-CH ₃	Dobra simétrico
(6)	1450	-	-	CH ₂	Tesoura
(7)	1542	1,881	2,741	N-H e/ ou C-N (Amida II)	Balanço no plano
(8)	1650	-	-	N-H e/ ou C-N (Amida II)	Dobramento no plano e ou / Estiramento assimétrico
(9)	2854	-	-	CH ₂	Estiramento simétrico
(10)	2877	-	-	CH-CH ₃	Estiramento simétrico
(11)	2931	1,600	0,662	CH ₂	Estiramento assimétrico
(12)	2962	-	-	CH ₃	Estiramento assimétrico
(13)	3093	1,625	2,076	N-H	Flexão Harmônica
(14)	3425	-	-	N-H	Estiramento

Tabela 3. Médias das abundâncias relativas e seus desvios-padrão para os compostos cuticulares obtidos nos grupos de fêmeas submetidas à aplicação de hormônio juvenil, acetona e grupo controle em *Mischocyttarus consimilis* em negrito os compostos majoritários.

Compostos	Índice calculado	Hormônio Juvenil Média ± DP (%)	Acetona Média ± DP (%)	Controle Média ± DP (%)
ND	1753	Tr	-	-
Octadecano	1800	Tr	-	Tr
X-Metilodadecano	1875	5,80±2,90	2,50±2,27	4,07±3,40
Nonadecano	1900	Tr	-	-
X-Metilnonadecano	1926	Tr	0,15±0,29	0,18±0,42
3-Metilnonadecano	1973	0,11±0,32	Tr	0,12±0,33
ND	1994	Tr	Tr	0,14±0,25
Eicosano	2000	0,15±0,19	Tr	0,17±0,23
Desconhecido	2097	0,01±0,04	0,04±0,11	0,12±0,14
Heneicosano	2100	0,14±0,15	0,11±0,16	0,10±0,18
2-metilheneicosano	2162	1,22±3,07	0,91±1,29	1,69±2,86
3- Metilheneicosano	2169	6,43±13,12	29,28±24,86	1,68±2,19
2- Metilheneicosano	2172	-	1,76±4,65	18,51±18,72
Docosano	2200	0,31±0,17	0,15±0,18	0,22±0,22
Tricosano	2300	0,18±0,17	0,10±0,14	0,47±0,26
Tetracosano	2400	0,18±0,16	Tr	0,15±0,15
Pentacosano	2500	0,81±0,38	0,76±0,33	1,55±0,64
5- Metilpentacosano	2552	1,70±0,94	1,26±0,82	2,11±1,18
3- Metilpentacosano	2570	0,12±0,16	Tr	0,21±0,24
Hexacosano	2600	0,37±0,55	1,22±2,90	0,24±0,12
2-Metilhexacosano	2654	0,85 ±2,38	1,04±2,69	0,14±0,14
ND	2668	Tr	Tr	0,20± 0,19
ND	2678	-	Tr	-
Heptacosano	2700	5,91±2,42	4,43±2,53	6,76±2,13
X-Metilheptacosano	2729	-	-	Tr
5- Metilheptacosano	2748	0,33±0,26	0,32±0,26	0,36±0,21
3- Metilheptacosano	2772	36,27±9,60	23,83±6,97	29,95±7,83
Octacosano	2800	0,42±0,33	0,22± 0,21	0,51±0,57
ND	2803	Tr	Tr	0,14±0,25
14-Metiloctacosano	2831	-	-	Tr
2-Metiloctacosano	2858	1,23±0,29	0,85±0,35	1,02±0,62
Nonacosano	2900	5,01±2,30	3,79±1,84	3,54±1,74
X- Metilnonacosano	2930	0,78±0,83	1,13±1,43	0,87±0,95
7- Metilnonacosano	2940	-	Tr	-
9, 15- Dimetilnonacosano	2957	-	0,23±0,37	0,14 ±0,37
3-Metilnonacosano	2974	12,57±5,74	8,74±3,99	6,18±4,08
X,Y- Dimetilheptacosano	2979	1,94±0,94	1,83±0,63	2,01±0,74
Triacotano	3000	4,11±1,02	4,82±2,16	5,63±2,35
14-Metiltriacontano	3034	-	0,52±0,90	0,59±1,16
X-Metiltriacontano	3048	1,61±4,55	-	-
ND	3085	-	0,17 ± 0,29	0,16 ± 0,43
Hentriacontano	3100	-	Tr	-
X-Metilhentriacontano	3122	0,96±0,88	1,79±1,54	3,65±1,86
11-Metilhentriacontano	3130	1,66 ±1,32	1,24±1,11	0,72 ±1,33
13,17Dimetilhentriacontano	3153	6,40±2,52	4,64 ±2,40	4,32±2,90
3-Methylhentriacontano	3177	Tr	0,26±0,28	0,11±0,28
Dotriacontano	3200	1,39±0,92	1,39±1,06	1,08±0,86
ND	3416	0,65±1,84	-	-

DP=desvio padrão; ND= Não identificado *Tr= traço (<0,1%)

*compostos identificados nas amostras COM abundância relativa igual ou inferior a 0,1%

Tabela 4. Compostos que apresentaram valores estatisticamente significativos com destaque nos 11 mais significativos para a separação dos grupos controle, de tratamento com acetona e com Hormônio juvenil em fêmeas recém emergidas da espécie *Mischocyttarus consimilis*.

Compostos	Índice calculado	Raiz 1	Raiz 2
Octadecano	1800	4,495	0,036
Desconhecido	1875	-11,212	0,919
Nonadecano	1900	-6,299	1,151
X-Metilnonadecano	1926	7,847	0,917
3-Metilnonadecano	1973	-13,256	1,193
Desconhecido	1994	-19,305	-0,829
Desconhecido	2162	-10,956	0,049
2-Metilheptacosano	2172	8,182	0,977
Tricosano	2300	12,657	-0,430
5-Metilpentacosano	2552	3,893	0,291
3- Metilpentacosano	2570	12,466	0,036
3- Metilheptacosano	2772	0,556	1,651
Octadecano	2800	-13,506	0,448
7-Metilnonadecano	2940	-1,617	0,139

Referências Bibliográficas

Agrahari M, Gadagkar R (2003). Juvenile hormone accelerates ovarian development and does not affect age polyethism in the primitively eusocial wasp, *Ropalidia marginata*. *Journal of Insect Physiology*. 49: 217-222.

Altmann J. 1974. Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour* 49: 227–266.

Beshers NS and Fewell HJ (2001). Models of division of labor in social insects. *Annual Review of Entomology*. 1 (46): 413.

Bonavita-Cougourdan A, Theraulaz G, Bagnères AG, Roux M, Pratte M, Provost E. and Clément JL (1991). Cuticular hydrocarbons, social organization and ovarian development in a *Polistes* wasp: *Polistes dominulus* Christ. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 100: 667-680.

Bussab WO and Morrettin PA (2002). *Estatística Básica*. 5 a ed. São Paulo: Saraiva.

Dani FR, Jones GR, Destri S, Spencer SH and Turillazzi S (2001): Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. *Animal Behaviour*. 62: 165-171.

Dapporto L, Sledge MF and Turillazzi S (2005). Dynamics of cuticular chemical profiles of *Polistes dominulus* workers in orphaned nests. *Journal Insect Physiology*. 51: 969-973.

Dietemann V, Peeters C, Liebig J, Thivet V and Hölldobler B (2003). Cuticular hydrocarbons mediate discrimination of reproductives and nonreproductives in the ant *Myrmecia gulosa*. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 100: 10341-10346

Fröhlich B, Tautz J and Riederer M. (2000). Chemometric classification of comb and cuticular waxes of the honeybee *Apis mellifera carnica*. *Journal of Chemical Ecology*. 26: 123-137.

Gadagkar R, Bhagavan S, Chandrashekara K and Vinutha C (1991). The role of larval nutrition in pre-imaginal biasing of caste in the primitively eusocial wasp *Ropalidia marginata* (Hymenoptera, Vespidae). *Ecological Entomology* 16: 435-440.

Giannotti E and Machado VLL (1999). Behavioral castes in the primitively eusocial wasp *Polistes lanio* Fabricius (Hymenoptera: Vespidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 43(3-4): 185-190.

Giray T, Giovanetti M and West-Eberhard MJ (2005). Juvenile hormone, reproduction, and worker behavior in the neotropical social wasp *Polistes canadensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102: 3330-3335.

Hair JF, Black WC, Babin BJ, Anderson RE and Tatham RL (2009). *Análise multivariada de dados*. Trad. Adonai Schlup Sant'Anna. Rev. Maria Aparecida Gouvêa. 6. ed. Porto Alegre, Bookman. 688p.

Holman L, Jorgensen CG, Nielsen J and d'Ettorre P (2010). Identification of an ant queen pheromone regulating worker sterility. *Proceedings of the Royal Society B* 277: 3793-3800.

Judd TM, Magnus RM and Fasnacht MP (2010). A nutritional profile of the social wasp *Polistes metricus*: differences in nutrient levels between castes and changes within castes during the annual life cycle. *Journal of Insect Physiology* 56: 42-56.

Holman LR, Lanfear and d'Ettorre P (2013). The evolution of Queen pheromones in the ant genus *Lasius*. *Journal of Evolutionary Biology*. 26:1549–1558.

Keller L and Nonacs P (1993). The role of queen pheromones in social insects: queen control or queen signal? *Animal Behaviour*. 45: 787-794

Lengyel F, Westerlund SA and Kaib M (2007). Juvenile hormone III influences task-specific cuticular hydrocarbon profile changes in the ant *Myrmecaria eumenoides*. *Journal of Chemical Ecology*. 33: 167–181

Michaelian KH (2003). *Photoacoustic Infrared Spectroscopy*. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.

Monnin T, Malosse C and Peeters C (1998). Solid Phase MicroExtraction and cuticular hydrocarbon differences related to reproductive activity in the queenless ant *Dinoponera quadricaps* *Journal of Chemical Ecology*. 24: 473-490.

Murakami ASN, Nunes TM, Desuó, IC, Shima SN and Mateus S (2015). The Cuticular Hydrocarbons Profiles in the Colonial Recognition of the Neotropical Eusocial Wasp, *Mischocyttarus cassununga* (Hymenoptera, Vespidae) .*Sociobiology* 62 (1): 109-115.

Neves EF, Andrade LHC, Suárez YR, Lima SM and Antonialli-Junior WF (2012). Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genetics and Molecular Research* 11 (3): 1891-1898.

Neves EF, Montagna, TS, Andrade LHC, Suárez YR, Lima SM and Antonialli-Junior WF (2013). Social Parasitism and Dynamics of Cuticular Hydrocarbons in Paper

- Wasps of the Genus *Mischocyttarus*. Journal of the Kansas Entomological Society. 86(1): 69–77.
- Nunes TM, Turatti IC, Mateus S, Nascimento FS, Lopes NP and Zucchi R. (2009). Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age, Genetics and Molecular Research. 8: 589-595.
- O'Donnell S and Jeanne RL (1993). Methoprene accelerates age polyethism in workers of a social wasp (*Polybia occidentalis*). Physiological Entomology. 18: 189-194.
- O'Donnell S (1998). Reproductive caste determination in eusocial wasps (Hymenoptera: Vespidae). Annual Review of Entomology. 43: 323-346.
- Queller DC and Strassmann JE (1989). Measuring inclusive fitness in social wasps. In: Breed MD, Page RE (eds) The genetics of social evolution. Genetics Selection Evolution. Westview Press, Boulder. 103-122
- Quinn GP and Keough MJ (2005). Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, Cambridge.
- Robinson GE and Ratnieks FLW (1987). Induction of premature honey bee (Hymenoptera; Apidae) flight by juvenile hormone analogs administered orally or topically. Journal of Economic Entomology. 80: 784-787.
- Robinson GE and Vargo EL (1997). Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 35: 559-583
- Röseler, P.F., Röseler, I., Strambi, A., Augier, R. 1984. Influence of insect hormones on the establishment of dominance hierarchies among foundresses of the paper wasp, *Polistes gallicus*. Behavioral Ecology and Sociobiology. 15: 133–142
- Röseler PF, Röseler I and Strambi A (1985). Role of ovaries and ecdysteroids in dominance hierarchy establishment among foundresses of the primitively social wasp, *Polistes gallicus*. Behavioral Ecology and Sociobiology. 18: 9-13.
- Röseler PF (1991). Reproductive competition during colony establishment. In: Ross KG, Matthews RW (eds.) The social biology of wasps, Cornell University, Ithaca. 309-335.
- Siegel S and Castellan JR NJ (2006). Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento; [Tradução: Carmona, S. I. C.], 2ª ed. Porto Alegre: Artmed.

Singer TL (1998). Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *American Zoologist* 38: 394-405.

Singer TL, Espelie KE and Gamboa, GJ (1998). Nest and nestmate discrimination in independent-founding wasps. In: Vander Meer RK, Breed MD, Winston ML and Espelie EK. editors. *Pheromone communication in social insects* 104-125. Boulder, Westview Press.

Sledge MF, Boscaro F and Turillazzi S (2001) Cuticular hydrocarbons and reproductive status in the social wasp *Polistes dominulus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 49: 401-409.

Sledge MF, Trinca I, Massolo A, Boscaro F and Turillazzi S (2004). Variation in cuticular hydrocarbon signatures, hormonal correlates and establishment of reproductive dominance in a polistine wasp *Journal of Insect Physiology*. 50: 73-83.

Smith BC (1999). *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Tofolo VC, Giannotti E, Neves EF, Andrade LHC, Lima SM, Suárez YR., Antonialli-Junior WF (2014). Polydomy in the ant *Ectatomma opaciventre*. *Journal of Insect Science*. 14 (21): 1-16.

Torres VO, Montagna TS, Fernandes WD and Antonialli-Junior WF (2011). Colony cycle of the social wasp *Mischocyttarus consimilis* Zikán (Hymenoptera: Vespidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 55(2): 247-252.

Torres VO, Montagna TS, Raizer J and Antonialli-Junior WF (2012). Division of labor in colonies of the eusocial wasp *Mischocyttarus consimilis*. *Journal of Insect Science*. 12:21

Van Zweden JS, Bonckaert W, Wenseleers T, and d'Ettorre P (2013). Queen signaling in social wasps. *Evolution*. 68: 976-986.

Wilson EO (1971). *The insect societies*. Cambridge, Belknap Press. 548pp

Zara FJ and Balestieri JBP (2000). Behavioural catalogue of *Polistes versicolor* Oliver (Vespidae: Polistinae) post-emergence colonies. *Naturalia* 25: 301-319.

Considerações Finais

A aplicação tópica de HJ em diferentes instares larvais de *Mischocyttarus consimilis* pode alterar o fenótipo de adultos recém emergidos, sua química cuticular e os padrões de reconhecimento visual das faces. O momento mais sensível, cuja elevação das taxas do hormônio Juvenil provoca os maiores efeitos é quando aplicado nos 3^o e 4^o instares larvais. O que reforça a hipótese de que uma alimentação diferenciada na fase larval pode levar a diferentes taxas de HJ originando fenótipos também distintos.

Já a aplicação tópica em recém-emergidos sugerem que há mudanças significativas na fisiologia das fêmeas, o que as torna mais agressivas, e leva à diminuição das taxas de forrageamento e, conseqüentemente há alteração na composição química cuticular. Essas fêmeas, portanto, apresentam potencial para dominância.