

RESUMO

Foram feitos estudos para identificação dos feromônios de trilha de *Atta laevigata* F. Smith e *Atta bisphaerica* Forel. Os resultados dos bioensaios indicaram que os componentes de marcação de trilha destas duas espécies são produzidos no sistema glândular do abdômen, sendo a glândula de veneno a principal fonte de armazenamento das substâncias responsáveis por esta atividade.

As formigas apresentam alta eficiência de seguimento da trilha artificial de seus próprios extratos, sugerindo que as substâncias que compõem o feromônio de trilha são intra-específicos.

A identificação do feromônio de trilha foi feita utilizando-se as técnicas de cromatografia em fase gasosa com coluna capilar acoplada à espectrometria de massa (CG/EM). Identificou-se o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila como o principal componente da glândula de veneno de *A. laevigata*; e o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila e a 3-etil-2,5-dimetilpirazina como os principais componentes da glândula de veneno de *A. bisphaerica*.

INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* são sérias pragas das plantas cultivadas e acarretam, no Brasil, grandes prejuízos. Para o controle dessas formigas têm sido empregados vários métodos, contudo, os resultados não têm sido satisfatórios, além de acarretarem danos ao meio ambiente (CHERRETT, 1986). Métodos alternativos têm sido procurados inclusive com o uso de feromônios (GASTON et al., 1967 e VILELA & HOWSE, 1988), que são componentes químicos produzidos pelos insetos para sua comunicação intraespecífica. O interesse por estas substâncias químicas, como opção ao uso dos inseticidas convencionais, tem aumentado consideravelmente. Já foram testados no controle de formigas do gênero *Atta*, alguns compostos do feromônio de marcação de trilha (ROBINSOM & CHERRETT, 1974; 1978).

O presente trabalho teve como objetivo a identificação das substâncias componentes do feromônio de trilha das formigas *Atta laevigata* e *Atta bisphaerica*, visando a fornecer subsídios para métodos alternativos de controle dessas pragas.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Colônias de Formigas

As colônias de formigas cortadeiras utilizadas neste estudo foram das espécies *A. laevigata* e *A. bisphaerica*, coletadas em Viçosa, MG, e mantidas no Insetário da seção de Entomologia, da Universidade Federal de Viçosa, sob condições de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e 70 a 75% de U.R., em estrutura conforme descrito em VILELA & HOWSE (1988).

2 - Extração do Feromônio de Trilha

(a) Extração de Glândulas

Abdômens de *A. laevigata* e *A. bisphaerica* foram separados do corpo de operárias evitando-se contato manual. A glândula de veneno (Glândula I), em todos os casos, foi coletada do abdômen com auxílio de micropinças. As glândulas saco-retal (glândula II) e de Dufour (glândula III), também foram extraídas dos abdômens de *A. laevigata* e *A. bisphaerica*, e acondicionadas em frascos de fundo cônico de 1 ml sendo, posteriormente, submetidas a ultra-som e maceradas com microbastão de vidro em $50 \mu\text{l}$ de CH_2Cl_2 .

(b) Extração dos Abdômens.

Foram macerados 50g de abdômens de cada espécie em 20 ml de CH_2Cl_2 , e a mistura filtrada em lâ de vidro silanizada e concentrada em evaporador rotatório a 40°C . 30 mg de extrato bruto foram microdestilados segundo OLIVEIRA (1975), obtendo-se o extrato bruto micro-destilado (EBMD).

3 - Bioensaios

Soluções em CH_2Cl_2 dos extratos bruto e bruto microdestilado de *A. laevigata* e *A. bisphaerica* foram testados em concentrações que variavam de 0,001 a $1 \mu\text{g}$ de extrato de saúva. μl^{-1} de solvente. O extrato glandular em concentrações de 0,01 a 10 ml liequivalentes (mEq) de glândulas de saúva. μl^{-1} de solvente.

Os bioensaios foram realizados nas mesmas condições de criação das colônicas com operárias de *A. laevigata* e *A. bisphaerica*, aprisionadas em placas de Petri, contendo algodão com solução de sacarose, por um período de seis horas antes do início dos ensaios.

Os extratos bruto, bruto microdestilado e glandular das espécies em estudo foram testados separadamente quanto à atividade de marcação de trilha.

As formigas foram liberadas no centro de um círculo de 15cm de raio feito sobre papel de filtro Whatman Nº 1, contido em caixa de madeira de 30 x 20 x 10 cm, coberta com tampa de vidro. Foram depositados uniformemente 20 µl dos extratos bruto, bruto microdestilado de glândula de veneno, separadamente, em cada teste, com seringa cromatográfica ao longo do círculo. Foram usadas para cada ensaio, 15 saúvas e as observações da atividade de seguimento de trilha foram feitas nos primeiros dois minutos. Considerou-se atividade de trilha quando a formiga seguiu pelo menos 3/4 da trilha artificial.

4 - Cromatografia de Fase Gasosa.

Os extratos foram inicialmente analisados por cromatografia de fase gasosa em um cromatógrafo VARIAN 3700, equipado com detector de ionização de chama (FID) acoplado a um processador integrador VARIAN 4270. A coluna (A) utilizada foi um capilar SE-30 "Cross Linked" tipo WCOT (wall coated open tubular) de 25 m x 0,20 mm (di), de sílica fundida; espessura do filme de 0,33µ; gás de arraste He, 1,0 ml.min⁻¹; chama, H₂, 30 ml.min⁻¹ e ar sintético, 300 ml.min⁻¹, "splitter": razão de 1:10, temperatura da coluna 80°C isotérmica por 1 min e então programada na razão de 5°C.min⁻¹ até a temperatura máxima de 250°C, permanecendo isotérmica por 25 min. Temperatura do injetor: 200°C, temperatura do detector: 280°C, atenuação de 2 x 10⁻¹¹ A.mV⁻¹.

5 - Espectrometria de Massa

A análise dos extratos no sistema de acoplamento da cromatografia de fase gasosa-espectrometria de massa (CG/EM), foi conduzida por impacto de elétrons (EI) a 70 eV, em um equipamento HP-5996A, acoplado a um computador HP-1000E. A coluna (A) foi utilizada nas mesmas condições da cromatografia em fase gasosa. As condições do espectrômetro de massa foram: injetor: 200°C, temperatura da fonte ionizadora: 250°C, analisador: 200°C e linha de transferência: 220°C. Foi injetado um volume padrão de 0,5 µl, medido em microseringa cromatográfica de 5 µl SGE (M.R.); e injeção do tipo "on column". Todos os cromatogramas em Corrente Total de íons (TIC) foram armazenados em computador, para análises posteriores.

6 - Interpretação dos Espectros de Massa

A interpretação dos espectros de massa, dos compostos separados dos extratos bruto microdestilado e das glândulas de veneno de *A. laevigata* e *A. bisphaerica*, foi feita do seguinte modo:

- (a) exame das características gerais do espectro;
- (b) determinação da massa molecular;
- (c) determinação da estrutura molecular. Esta determinação foi realizada com apoio do sistema computacional do espectrômetro de massa, que compara espectros de massa dos compostos orgânicos obtidos da amostra, com os contidos em sua biblioteca.
- (d) Análise aritmética e mecanística dos espectros.

Foi utilizada a técnica de monitoramento de íons conhecida como "Select Ion Monitoring" (SIM), que monitorava os íons característicos dos compostos obtidos da análise mecanística e de seu padrão de fragmentação, permitindo melhor identificação dos compostos no TIC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - Bioensaios

O resultado dos ensaios biológicos, em laboratório, com os extratos bruto, bruto microdesilado e glandular de *A. laevigata* e *A. bisphaerica* mostrou alta atividade de trilha, o que sugere a presença dos componentes do feromônio no sistema glandular posterior destas formigas.

Estes resultados evidenciaram também que as respostas aos próprios extratos foram muito mais acentuadas do que para uma outra espécie em teste. Isto sugere a possível presença de componentes comuns e intra-específicos que diferenciam a trilha das duas espécies.

O Quadro 1 mostra os resultados dos diferentes ensaios biológicos realizados, em laboratório, com os extratos bruto, microdestilado e glandular dessas formigas. Nota-se que a maior atividade de trilha ocorreu quando se utilizou extratos glandulares.

O quadro 2 mostra os resultados dos ensaios biológicos realizados com as glândulas isoladas de *A. laevigata* e *A. bisphaerica*. Os testes mostram que as substâncias responsáveis pela marcação de trilha encontram-se, principalmente, na glândula de veneno (Glândula I). A atividade verificada para as demais glândulas pode ser devida à contaminações ou à presença das substâncias da glândula I em canais comuns do sistema glandular posterior dessas formigas.

QUADRO 1 - Percentagem de Operárias de *Atta laevigata* (AL) e *Atta bisphaerica* (AB) que seguiram Trilhas Confeccionadas com Extratos Bruto (EB), Bruto Microdestilado (EBMD) e Glandular (EGL) das Respectivas Espécies.

Extratos **	% de Operárias *	
	AL	AB
EB (AL)	53	20
EB (AB)	40	46
EBMD (AL)	66	20
EBMD (AB)	26	60
EGL (AL)	66	26
EGL (AB)	20	73
CH ₂ Cl ₂	0	0

* Nº de ensaios = 10; Nº de formigas por ensaio = 15

** Volume de Extrato por ensaio = 20 µl.

QUADRO 2 - Percentagem de Operárias de *Atta laevigata* (AL) e *Atta bisphaerica* (AB) que seguiram Trilhas Confeccionadas com Glândulas Isoladas do Abdômen das Respectivas Espécies.

Extratos **	% de Operárias *	
	AL	AB
Glândula I	73	80
Glândula II	40	26
Glândula III	33	40
I + II	62	66
I + III	85	73
II + III	13	24
I + II + III	53	53
I + II + III + Líquido Abdominal	60	53

Glândula I = glândula de veneno;
 Glândula II = glândula saco retal;
 Glândula III = glândula de Dufour.

* Nº de ensaios = 10; Nº de formigas por ensaio = 15.

** Volume de Extrato por Ensaio = 20 µl.

2 - Cromatografia em Fase Gasosa e Espectrometria de Massa.

Os cromatogramas do extrato bruto microdestilado de *A. laevigata* e *A. bisphaerica*, mostram a presença de uma série de picos, com certa similaridade no padrão de separação. As diferenças entre os picos na comparação dos cromatogramas sugerem a presença de componentes intra-específicos.

Os extratos da glândula de veneno das formigas *A. laevigata* e *A. bisphaerica* foram introduzidos no sistema (CG/EM), para separação e identificação dos componentes do feromônio de trilha. A identificação das substâncias separadas do extrato realizou-se a partir do TIC, o qual permite a reprodução dos cromatogramas após fornecer o espectro de massa de cada componente separado.

No TIC (Figura 1) do extrato bruto microdestilado do abdômen de *A. laevigata* identificaram-se, a diferentes tempos de retenção, vários componentes: benzaldeído (PM = 120); 1,7,7-trimetilbicyclo-[2.2.1]-2-hepteno (PM = 136); 1-octanol (PM = 120); 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (PM = 139) e o ácido fenilacético (PM = 136).

Na Figura 2, mostra-se o TIC (Figura 2A) do extrato da glândula de veneno da formiga *A. laevigata*, do qual identificou-se, ao tempo de retenção de 10.40 min, o composto de peso molecular 139 (Figura 2C), que por seu padrão de fragmentação do espectro, corresponde ao 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1967 e GOTTLIER *et al.*, 1983). A identificação deste composto fez-se através da técnica (SIM), monitorando os íons característicos originários da molécula fragmentada, tais como m/z: 53, 79, 80, 107, 108 e 139.

De acordo com o TIC (Figura 2A), o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila foi identificado com o principal componente da glândula de veneno de *A. laevigata*, o que sugere, ser este composto o maior responsável pela marcação de trilha desta formiga. Este resultado está de acordo com o reportado por OLIVEIRA *et al.* (1987) e além disso a mesma substância tem sido identificada para outras espécies do gênero *Atta* (TUMLINSON *et al.*, 1971, RILEY *et al.*, 1974 e OLIVEIRA, 1975). Também no TIC (Figura 2A), identificou-se, ao tempo de retenção de 24.67 min o composto de peso molecular 136, que por seu padrão de fragmentação no espectro de massa corresponde ao ácido fenilacético.

O quadro 3 mostra todos os componentes identificados de *A. laevigata*, com seus respectivos padrões de fragmentação.

A Figura 3, mostra o TIC (Figura 3A) do extrato de glândula de veneno de *A. bisphaerica*, do qual identificou-se, ao tempo de 6.95 min o composto de peso molecular 94 que por seu padrão de fragmentação no espectro de massa corresponde ao fenol e a 9.61 min o composto de peso molecular 136 (Figura 3C) que por seu padrão de fragmentação no espectro de massa corresponde a 3-etil-2,5-dimetilpirazina (BUDZIKIEWICZ *et al.*,

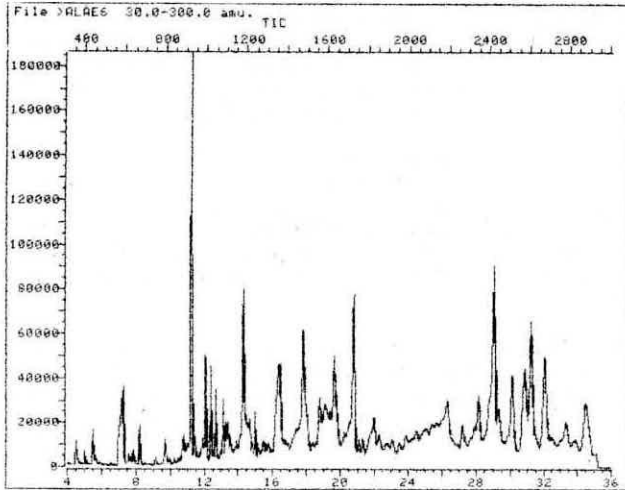


FIGURA 1 - TIC do Extrato Bruto Microdestilado de *Atta laevigata*. Cromatografado em Coluna (A).

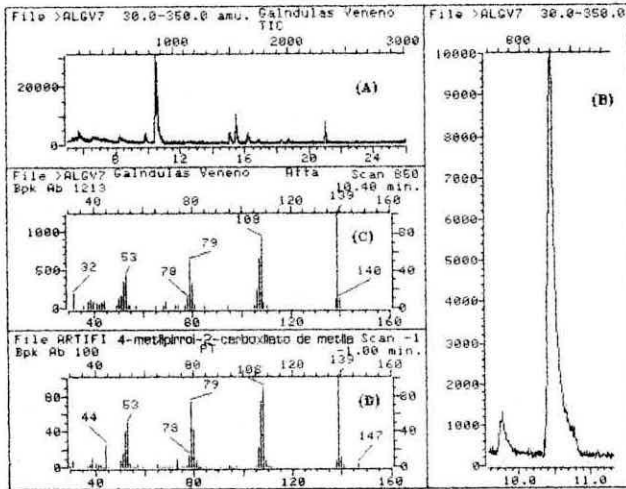


FIGURA 2 - (A) TIC do Extrato de Glândulas de Veneno de *A. laevigata*.
 (B) "Zoom" do Pico em 10.40 min
 (C) Espectro de Massa do Pico em 10.40 min
 (D) Padrão de Fragmentação do 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila.

QUADRO 3 - Compostos Identificados em *Atta laevigata*.

Compostos	Íon [M+]	Padrão de Fragmentação			
		m/z (Abundância Relativa) %			
Benzaldeído*	106	36 (39), 77(100), 107(10)	38(22), 78(22),	49(31), 105(89),	51(52), 106(92),
1,7,7-trimetil biciclo [2.2.1] -2-hepteno*	136	43(40), 77(22), 107(14),	53(26), 79(37), 121(15),	67(70), 93(64), 136(14),	68(100), 94(22), 137(2)
1-octanol*	112	42(38), 69(77), 84(67)	55(85), 70(64),	56(100), 71(15),	68(18), 83(43),
4-metilpirrol- 2 carboxilato de metila	139	39(28), 80(44), 140(7)	52(37), 107(70),	53(53), 108(100),	79(83), 139(93),
Ácido fenil- acético	136	45(8), 91(100),	50(3), 92(18),	63(7), 136(25),	89(5), 137(1),

* Compostos identificados no extrato bruto microdestilado (cf. Figura 1).

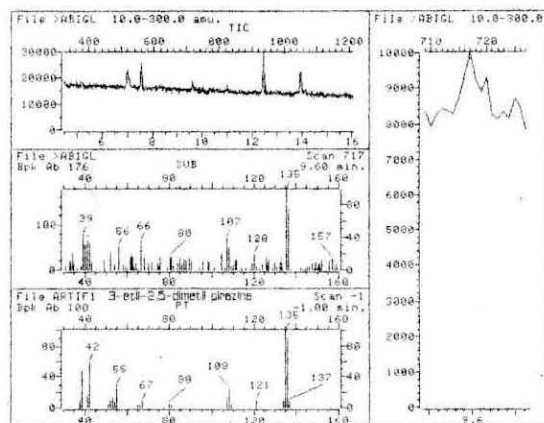


FIGURA 3 - (A) TIC do Extrato de Glândulas de Veneno de *A. bisphaerica*.
 (B) "Zoom" do Pico em 9.61 min.
 (C) Espectro de Massa do Pico em 9.61 min.
 (D) Padrão de Fragmentação da 3-etil-2,5-dimetilpirazina.

1967 e GOTTLIEB *et al.*, 1983). A identificação deste composto na glândula de veneno de *A. bisphaerica* fez-se através da técnica "SIM", monitorando os íons característicos, tais como m/z 107, 108, 121, 135 e 136, localizados no TIC da Figura 3A. Este composto já foi reportado para as espécies *Atta cephalotes*, *Atta sexdens rubropilosa* (CROSS *et al.*, 1979 e 1982; EVERSLED & MORGAN, 1981 e ROBINSON & CHERRET, 1974).

Segundo MORGAN (1984), esta pirazina funciona como um componente ativo do comportamento em nove espécies de *Myrmica*, duas espécies de *Atta* e uma de *Tetramorium*.

Também no TIC (FIGURA 3A), identificou-se ao tempo de retenção de 14.02 min, o composto de peso molecular 139 que por seu padrão de fragmentação no espectro de massa, corresponde ao 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila.

O 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila tem sido reportado para as formigas *Attini* e *Trachomyrmex*, como o componente principal do feromônio de trilha, e também para três espécies de *Atta*, sendo aproximadamente 0,1% do conteúdo da glândula de veneno (MORGAN, 1984).

O Quadro 4, mostra os principais compostos identificados em *A. bisphaerica* com seus respectivos padrões de fragmentações.

QUADRO 4 - Compostos Identificados em *Atta bisphaerica*

Compostos	Íon [M ⁺]	Padrão de Fragmentação			
		m/z (Abundância Relativa) %			
4-metilpirrol-2-carboxilato de metila	139	39(28), 80(44), 140(7)	52(37), 107(70)	53(53), 108(100)	79(83), 139(93)
3-etil-2,5-dimetilpirazina	136	27(27), 53(12), 108(23), 136(90)	39(47), 55(29), 109(4), 137(8)	41(10), 80(5), 121(9)	42(59), 107(12), 135(100)
fenol	94	36(38), 55(22), 95(10)	38(25), 65(29)	39(48), 66(47)	41(28), 94(100)

AGRADECIMENTOS

A equipe do Projeto "Estudo Químico-Ecológico de Pragas Agrícolas e Florestais", agradece à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), o apoio financeiro que vem recebendo, sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

LITERATURA CITADA

- BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C.; WILLIAMS, D.H. Mass Spectrometry of Organic Compounds. San Francisco, 1 ed. Holden-day, 1967. 690 p.
- CHERRET, J.M. History of the leaf-cutting ant problem. In: LOFGREEN, C.S. & VANDER-MEER, R.K. eds. *Fire Ants and Leaf-Cutting Ants*, Biology and Management. Boulden, Westview Press, 1986. p. 10-17.
- CROSS, J.H.; BYLER, R.C.; RAVID, V.; SILVERSTEIN, R.M.; ROBINSON, S.W.; BAKER, P.M.; OLIVEIRA, J.S.; JUTSUM, A.R.; CHERRET, J.M. The major component of the trail pheromone of the leaf cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine. *J. Chem. Ecol.* 5(2): 187-203, 1979.
- CROSS, J.H.; WEST, J.R.; SILVERSTEIN, R.M.; JUTSUM, A.R.; CHERRETT, J.M. Trail pheromone of leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (REICH) (Formicidae: Myrmicinae). *J. Chem. Ecol.* 8(8): 119-124, 1982.
- EVERSHED, R.P. & MORGAN, E.D. Chemical investigation of the Dufour gland contents of *Attine* ants. *Insect Biochem.* 11(3): 343-351, 1981.
- GASTON, L.K.; SHOREY, H.H.; SAARTO, C.A. Insect population control by using sex pheromones to inhibit orientation between the sexes. *Nature* 213: 1155, 1967.
- GOTTLIEB, O.R.; BRAZ FILHO, R.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W. Introduction a la espectrometria de massa de substancias orgânicas. 2 ed., Washington, O.E.A., 1983. 138 p.
- MORGAN, E.D. Chemical words and phrases in the language of pheromones for foraging and recruitment. In: LEWIS, T. ed., *Insect Communication*, London, Academic Press, 1984. p. 169-194.

- OLIVEIRA, J.S. *Estudo dos feromônios de Atta sexdens rubropilosa e Atta robusta*. Rio de Janeiro, RJ. CPPN-UFRJ, 1975. 92 p. (Tese de Mestrado).
- OLIVEIRA, J.S.; CARNIERI, N.; VILELA, E.F. The major component of the poison gland of the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. In: EDER, J. & REMBOLD, M. ed. *Chemistry and Biology of Insects Societies*, München, Verlag, 1987. p. 424.
- RILEY, R.G.; SILVERSTEIN, R.M.; CARROL, B.; CARROL, R. Methyl-4-methylpyrrole-2-carboxylate: a volatile trail pheromone from the leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. *J. Insect Physiol.* 20: 651-654, 1974.
- ROBINSON, S.W. & CHERRETT, J.M. Laboratory investigations of the trail-following responses of four species of leaf-cutting ants with notes on the specificity of a trail pheromone of *Atta texana* (Buckley). *Insectes Soc.* 24: 87-94, 1974.
- ROBINSON, S.W. & CHERRET, J.M. The possible use of methyl-4-methylpyrrole carboxylate, an ant trail pheromone, as a component of an improved bait for leaf-cutting ant (Hymenoptera: Formicidae) control. *Bull. ent. Res.* 68: 159-170, 1978.
- TUMLINSON, J.H.; SILVERSTEIN, R.M.; MOSER, J.C.; BROWLEE, R. G.; RUTH, J.M. Identification of the trail pheromone of a leaf-cutting ant *Atta texana*. *Nature* 234: 348-349, 1971.
- VILELA, E.F. & HOWSE, P.E. Pheromone performance as an attractive component in baits for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). *An. Soc. ent. Brasil* 17(supl.): 107-124, 1988.