

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Augusto Henrique Arantes Portugal

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

DEFESA QUÍMICA EM LARVAS DA BORBOLETA
***MECHANITIS POLYMNIA* (NYMPHALIDAE: ITHOMIINAE)**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

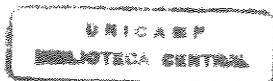
Orientador: Prof. Dr. José Roberto Trigo

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Augusto Henrique Arantes Portugal e aprovada pela Comissão Julgadora.

2001

14/02/2001

Len. Roberto Trigo



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/ UNICAMP
	P838d
V.	Ex.
TOMBO BC/	45941
PROC.	16-392/01
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00
DATA	16-08-01
N.º CPD	

CMOD158798-4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

P838d Portugal, Augusto Henrique Arantes
Defesa química em larvas da borboleta *Mechanitis polymnia*
(Nymphalidae: Ithomiinae)/Augusto Henrique Arantes Portugal. --
Campinas-SP. [s.n.], 2001.
179p. Il.

Orientador: José Roberto Trigo
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas..
Instituto de Biologia.

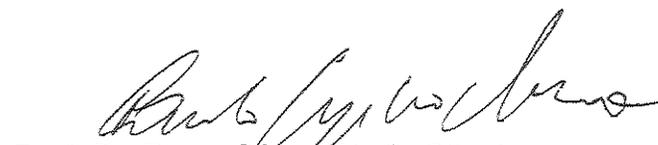
1. Lípidios. 2. Predação. 3. Parasitismo. I. Trigo, José Roberto.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biología. III. Título.

Data da Defesa: 14/02/2001

Banca Examinadora



Prof. Dr. José Roberto Trigo (Orientador)



Prof. Dr. Paulo Sérgio M. C. Oliveira



Prof. Dr. Antônio Carlos Siani

Dr. André Victor Lucci Freitas

“Try not. Do. Or do not. There is no try.”

Yoda

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu orientador e amigo José Roberto Trigo pela excelente orientação, por tanto me ensinar sobre tantas coisas em todos estes anos de trabalho conjunto e por me introduzir ao louco mundo da química das borboletas.

À UNICAMP, pelo aprendizado desde a graduação.

À FAPESP, pelo apoio financeiro na forma de uma bolsa de Mestrado e Reserva Técnica (98/00765-5) que possibilitaram a realização do trabalho. Ao Instituto Agrônomo de Campinas (Fazenda Santa Elisa - Campinas), ao Instituto de Botânica de São Paulo (Fazenda Campininha – Mogi Guaçu) e à Guarda Municipal de Jundiaí (Serra do Japi), por permitirem a entrada nas áreas sob sua responsabilidade para realização de parte do trabalho.

Aos membros da pré-banca Prof. Dr. Paulo Sérgio Oliveira, Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli e Dr. André Victor Lucci Freitas, pela leitura crítica da dissertação e suas sugestões.

Ao André Victor (Baku), por me passar um pouco da sua experiência na coleta, identificação e criação das larvas das borboletas.

Ao Paulinho, por me ensinar a coletar e criar as formigas.

À Flávia Natércia, por me iniciar no mundo das formigas.

A todos que me ajudaram no campo e na coleta dos organismos: Ana Beatriz, Inara, Karina, Baku, Paulinho, Zé Trigo, Fernandinha, Flávia Sá, Viviane, Má, Glauco, Arlindo. Se seu nome não foi listado mas tiver me ajudado no campo eu te agradeço também.

A todos que estão ou passaram pelo lab, Ana, Karina, Fabiana, Tatiana, Zeca, Marcão, Edu, Flávia, Chris, Vivi, Popó, Lucila, Luciana, Paiva, Nice, por fazerem de lá um lugar quase insano e muito bom de se trabalhar.

À Má, Pepê, Márcio, Chris, Jager, Luiz Vítor, Totó e ao pessoal do vôlei e da rocha, pela amizade e por e me lembrarem que existe vida fora do laboratório.

A meus pais, Henrique e Vitória, e à minha irmã, Carol, por seu amor e por me darem tudo mais que eu precisasse para ser o que eu quisesse.

À Má, por seu amor, paciência, apoio, ajuda no campo e lab, leitura, discussões, sugestões e idéias dadas ao trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XIV
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVIII
1. PREFÁCIO	1
2. CAPÍTULO I: MORTALIDADE DE IMATUROS DE <i>MECHANITIS POLYMNIA</i> NO AMBIENTE NATURAL	4
2.1. INTRODUÇÃO	4
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	6
2.2.1. ORGANISMOS ESTUDADOS	6
2.2.2. MORTALIDADE DE <i>MECHANITIS POLYMNIA</i> NO AMBIENTE NATURAL	9
2.3. RESULTADOS	14
2.3.1. MORTALIDADE DE <i>MECHANITIS POLYMNIA</i> NO AMBIENTE NATURAL	14
A. INIMIGOS NATURAIS	14
B. MORTALIDADE EM DIFERENTES PLANTAS HOSPEDEIRAS	15
C. CAUSAS DE MORTALIDADE	24
2.3.2. INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS	29
A. NA OVIPOSIÇÃO	29
B. NO DESENVOLVIMENTO	29
2.4. DISCUSSÃO	40

3. CAPÍTULO II: LIPÍDIOS CUTICULARES NA DEFESA DE IMATUROS DE <i>MECHANITIS</i>	
<i>POLYMNIA</i>	58
3.1. INTRODUÇÃO	58
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	65
3.2.1. DEFESAS QUÍMICAS EM IMATUROS. BIOENSAIOS COM LEPIDÓPTEROS	
VIVOS	65
3.2.1.1. COLETA E MANUTENÇÃO DE ORGANISMOS	68
A. <i>CAMPONOTUS CRASSUS</i>	68
B. IMATUROS DE LEPIDÓPTEROS	69
3.2.1.2. BIOENSAIOS COM <i>CAMPONOTUS CRASSUS</i>	70
3.2.2. LIPÍDIOS CUTICULARES COMO SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS	
PROMOVENDO DEFESA	72
3.2.2.1. EXTRAÇÃO E ANÁLISES DE LIPÍDIOS CUTICULARES	72
3.2.2.2. SIMILARIDADE QUÍMICA <i>VERSUS</i> PREDACÃO POR FORMIGAS	76
3.2.2.3. EXPERIMENTOS DE MUDANÇA DA SIMILARIDADE QUÍMICA	
ATRAVÉS DE MUDANÇA DA PLANTA HOSPEDEIRA	81
3.2.2.4. EXPERIMENTOS DE MUDANÇA DO PADRÃO QUÍMICO DE	
LIPÍDIOS CUTICULARES	83
3.2.3. SIMILARIDADE QUÍMICA ENTRE BORBOLETAS <i>ITHOMIINAE</i> E SUAS	
PLANTAS HOSPEDEIRAS	90
3.3. RESULTADOS	92
3.3.1. BIOENSAIOS COM LEPIDÓPTEROS VIVOS	92
3.3.2. SIMILARIDADE QUÍMICA <i>VERSUS</i> PREDACÃO POR FORMIGAS	95

3.3.3. EXPERIMENTOS DE MUDANÇA DA SIMILARIDADE QUÍMICA ATRAVÉS DE MUDANÇA DA PLANTA HOSPEDEIRA	116
3.3.4. EXPERIMENTOS DE MUDANÇA DO PADRÃO QUÍMICO DE LIPÍDIOS CUTICULARES	118
3.3.5. SIMILARIDADE QUÍMICA ENTRE BORBOLETAS ÍTHOMIINAE E SUAS PLANTAS HOSPEDEIRAS	120
3.4. DISCUSSÃO	122
4. CONCLUSÃO	135
5. BIBLIOGRAFIA	136
6. APÊNDICES	153
6.1. APÊNDICE I: ESPECTROS DE MASSAS DE SUBSTÂNCIAS NÃO IDENTIFICADAS EM <i>MECHANITIS POLYMNIA</i> – AMOSTRA 1 E <i>SOLANUM TABACIFOLIUM</i>	153
6.2. APÊNDICE II: ESPECTROS DE MASSAS DE SUBSTÂNCIAS NÃO IDENTIFICADAS EM <i>METHONA THEMISTO</i> E <i>BRUNFELSIA UNIFLORA</i>	155
6.3. APÊNDICE III: ESPECTROS DE MASSAS DE SUBSTÂNCIAS NÃO IDENTIFICADAS EM <i>EPITYCHES EUPOMPE</i> E <i>AURELIANA FASCICULATA</i>	157
6.4. APÊNDICE IV: ESPECTROS DE MASSAS DE SUBSTÂNCIAS NÃO IDENTIFICADAS EM <i>PLACIDULA EURYANASSA</i> E <i>BRUGMANSIA SUAVEOLENS</i>	159
6.5. APÊNDICE V: ESPECTROS DE MASSAS DE SUBSTÂNCIAS NÃO IDENTIFICADAS EM <i>MECHANITIS POLYMNIA</i> E <i>SOLANUM PANICULATUM</i>	161

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Larvas em 5^o estágio em *Solanum mauritianum* (A) e adulto (B) de *Mechanitis polymnia* fotografado na Serra do Japi, Jundiaí, SP 8
- Figura 2.2.** Medianas da sobrevivência de um estágio de desenvolvimento ao seguinte em imaturos de *Mechanitis polymnia* em diferentes plantas hospedeiras 17
- Figura 2.3.** Sobrevivência acumulada calculada em *Mechanitis polymnia* de ovos a adultos recém emergidos em diferentes plantas hospedeiras 22
- Figura 2.4.** Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para imaturos de *Mechanitis polymnia* se desenvolvendo em diferentes plantas hospedeiras 23
- Figura 2.5.** Medianas da mortalidade [e quartis 25 (inferior) e 75% (superior)] de ovos de *Mechanitis polymnia* em diferentes plantas hospedeiras 26
- Figura 2.6.** Medianas da mortalidade (e quartis 25 e 75%) de pupas de *Mechanitis polymnia* em diferentes plantas hospedeiras 27
- Figura 2.7.** Oviposição de *Mechanitis polymnia* e pluviosidade diária na floresta secundária durante o acompanhamento realizado no campo 31 a 36
- Figura 2.8.** Regressão linear entre a data de início do acompanhamento de desovas de *Mechanitis polymnia* e seu tempo de desenvolvimento até o 5^o estágio larval em *Solanum concinnum* 37
- Figura 2.9.** Regressão linear entre a temperatura média durante o desenvolvimento de desovas de *Mechanitis polymnia* e seu tempo de desenvolvimento até o 5^o estágio larval em *Solanum concinnum* 38
- Figura 2.10.** Média do tempo de desenvolvimento de imaturos de *Mechanitis polymnia* de ovos ao 5^o estágio larval em diferentes plantas hospedeiras 39

Figura 3.1. Imaturos de 5 ^o estágio de borboletas utilizados nos experimentos	67
Figura 3.2. Regressões linear e exponencial do índice de retenção de alcanos lineares no tempo de retenção.	79
Figura 3.3. Experimentos de mudança do padrão químico de lipídios cuticulares com larvas liofilizadas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	89
Figura 3.4. Espectro de massas de hentriacontano (PM 436)	96
Figura 3.5. Espectro de massas de 13, 21 - dimetilpentatriacontano (PM 520)	97
Figura 3.6. Espectro de massas por impacto de elétrons (A) e ionização química por metano (B) da substância correspondente ao pico número 22 de <i>Placidula euryanassa</i>	98 a 99
Figura 3.7. Cromatogramas dos extratos hexânicos cuticulares de larvas de <i>Mechanitis polymnia</i> e folhas de <i>Solanum tabacifolium</i> – amostra 1	102
Figura 3.8. Cromatogramas dos extratos hexânicos cuticulares de larvas de <i>Methona themisto</i> e folhas de <i>Brunfelsia uniflora</i>	104
Figura 3.9. Cromatogramas dos extratos hexânicos cuticulares de larvas de <i>Epityches eupompe</i> e folhas de <i>Aureliana fasciculata</i>	106
Figura 3.10. Cromatogramas dos extratos hexânicos cuticulares de larvas de <i>Placidula euryanassa</i> e folhas de <i>Brugmansia suaveolens</i>	109
Figura 3.11. Cromatogramas dos extratos hexânicos cuticulares de larvas de <i>Mechanitis polymnia</i> alimentadas com <i>Solanum paniculatum</i> e folhas de <i>Solanum paniculatum</i>	112
Figura 3.12. Médias \pm 1 desvio padrão do índice de Morisita de espécies com baixas e altas taxas de predação	115

Figura 3.13. Percentagem de predação de larvas liofilizadas de <i>Mechanitis polymnia</i> alimentadas com folhas de <i>Solanum tabacifolium</i> colocadas em diferentes plantas em experimentos de 24 horas de duração frente a <i>Camponotus crassus</i>	117
Figura 3.14. Índices de Visitação em larvas experimental em <i>Solanum tabacifolium</i> (ALTA SIMILARIDADE - padrão químico da cutícula semelhante ao padrão da folha), em <i>Brugmansia suaveolens</i> (BAIXA SIMILARIDADE - padrão químico da cutícula diferente da folha) e <i>Solanum tabacifolium</i> (CONTROLE - padrão químico da cutícula diferente da folha)	119
Figura 6.1. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 5 Tabela 3.4 e Figura 3.7.	153
Figura 6.2. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 9 Tabela 3.4 e Figura 3.7.	154
Figura 6.3. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 6 Tabela 3.5 e Figura 3.8.	155
Figura 6.4. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 14 Tabela 3.5 e Figura 3.8.	156
Figura 6.5. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 6 Tabela 3.6 e Figura 3.9.	157
Figura 6.6. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 11 Tabela 3.6 e Figura 3.9.	158
Figura 6.7. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 1 Tabela 3.7 e Figura 3.10.	159

Figura 6.8. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 4 Tabela 3.7 e Figura 3.10.

160

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Sobrevivência de imaturos de <i>Mechanitis polymnia</i> em diferentes plantas hospedeiras	17
Tabela 2.2. Percentagem de sobrevivência acumulada e taxas de risco (“hazard rates”) para imaturos de <i>Mechanitis polymnia</i> em diferentes plantas hospedeiras	21
Tabela 2.3. Causas de mortalidade de pupas e sobrevivência de pupas a adultos em <i>Mechanitis polymnia</i> em diferentes plantas hospedeiras	28
Tabela 3.1. Espécies e amostras utilizadas para comparação de índices de similaridade (lepidóptero – planta hospedeira) entre lepidópteros com altas e baixas taxas de predação nos bioensaios com <i>Camponotus crassus</i>	80
Tabela 3.2. Relação de lepidópteros e plantas hospedeiras analisados quanto a lipídios cuticulares, similaridade química entre o padrão de lipídios cuticulares das larvas e das folhas de suas plantas hospedeiras	91
Tabela 3.3. Mediana da percentagem de predação de larvas de <i>Mechanitis polymnia</i> , <i>Methona themisto</i> , <i>Epityches eupompe</i> e <i>Placidula euryanassa</i> em ensaios com <i>Camponotus crassus</i> em laboratório	94
Tabela 3.4. Substâncias encontradas nos extratos hexânicos da cutícula de larvas de <i>Mechanitis polymnia</i> e de folhas de <i>Solanum tabacifolium</i> – amostra 1 através da análise por GC-MS	103
Tabela 3.5. Substâncias encontradas nos extratos hexânicos da cutícula de larvas de <i>Methona themisto</i> e de folhas de <i>Brunfelsia uniflora</i> através da análise por GC-MS	105

Tabela 3.6. Substâncias encontradas nos extratos hexânicos da cutícula de larvas de <i>Epityches eupompe</i> e de folhas de <i>Aureliana fasciculata</i> através da análise por GC-MS	107
Tabela 3.7. Substâncias encontradas nos extratos hexânicos da cutícula de larvas de <i>Placidula euryanassa</i> e de folhas de <i>Brugmansia suaveolens</i> através da análise por GC-MS	110
Tabela 3.8. Substâncias encontradas nos extratos hexânicos da cutícula de larvas de <i>Mechanitis polymnia</i> alimentadas com <i>Solanum paniculatum</i> e de folhas de <i>S. paniculatum</i> através da análise por GC-MS	113
Tabela 3.9. Índices de similaridade para cada par larva – planta hospedeira obtidos a partir das substâncias encontradas nas análises por GC-MS	114
Tabela 3.10. Índices de similaridade de Morisita para os padrões químicos das cutículas de lepidópteros e suas respectivas plantas hospedeiras	121

RESUMO

Os imaturos de lepidópteros estão sujeitos a altas taxas de mortalidade no ambiente natural. Uma das formas de defesa mais utilizadas e estudadas é a defesa química, envolvendo, por exemplo, substâncias tóxicas ou impalatáveis. Estas substâncias podem ser adquiridas pelos lepidópteros de suas fontes alimentares ou biosintetizadas *de novo*. Através de um acompanhamento dos imaturos de *Mechanitis polymnia* no campo observou-se que larvas apresentam as taxas mais altas de sobrevivência quando comparadas a ovos e pupas. A sobrevivência de ovos a adultos de *Mechanitis polymnia* em *Solanum tabacifolium* (área urbana) foi maior do que em *Solanum mauritianum* e *Solanum concinnum* (ambos floresta secundária). Experimentos realizados em laboratório com a formiga predadora generalista *Camponotus crassus* confirmaram a capacidade de defesa de larvas de *Mechanitis polymnia* contra predadores. Além disto verificou-se que o tipo de defesa envolvida seria provavelmente defesa química e que as substâncias de defesa estariam localizadas na superfície das larvas já que a rejeição pelas formigas se dava após breve contato inicial. Uma classe de substâncias possivelmente responsáveis pela defesa seriam os lipídios cuticulares (LCs). Lipídios cuticulares de insetos e plantas terrestres tem como principal função, proteção contra dessecação. Por se localizarem na superfície externa do corpo, podem estar envolvidos em mecanismos de comunicação química tanto inter, quanto intraespecífica. Desta forma, investigou-se o papel de lipídios cuticulares na defesa de larvas de *Mechanitis polymnia* contra a formiga predadora generalista *Camponotus crassus*. Verificou-se que o padrão químico de LCs de larvas de *Mechanitis polymnia* e de folhas de *Solanum tabacifolium* é

muito semelhante, ao contrário de outros Ithomiinae e suas plantas hospedeiras. *Camponotus crassus* não predou larvas vivas ou mortas de *Mechanitis polymnia* em bioensaios em laboratório, porém predou larvas vivas de outros Ithomiinae. Formulou-se a hipótese de que as formigas não reconheceram as larvas de *Mechanitis polymnia* como presa devido à sua incapacidade de diferenciar as larvas das folhas de *Solanum tabacifolium*, causada pela similaridade do padrão químico dos LCs. Quando larvas de *Mechanitis polymnia* foram colocadas em uma situação de baixa similaridade com a folha em que elas se encontravam, elas passaram a ser predadas por *Camponotus crassus*. Larvas palatáveis de *Spodoptera frugiperda* foram utilizadas em bioensaios de dupla escolha para comprovar o papel dos LCs nesta defesa química. Dois bioensaios foram realizados: 1. A larva experimental se encontrava em situação de alta similaridade e foi menos visitada pelas formigas; 2. A larva experimental estava em situação de baixa similaridade e foi visitada de forma igual à larva controle. Isto demonstrou que um padrão químico de LCs semelhante ao de uma folha pode ser uma defesa eficiente contra predadores quimicamente orientados como *Camponotus crassus*. Do ponto de vista da formiga a larva estaria quimicamente camuflada na folha de sua planta hospedeira.

ABSTRACT

Immature Lepidoptera are subject to high mortality rates in the natural environment. Chemical defences are one of the best studied and known mechanisms of defence employed by butterflies. In the field, it was observed that larval survivorship is higher than the survivorship of eggs or pupae. The survivorship of *Mechanitis polymnia* from eggs to imagoes on *Solanum tabacifolium* (urban area) was higher than on *Solanum mauritianum* or *Solanum concinnum* (both in a secondary forest). Laboratory experiments assured the defence capability of *Mechanitis polymnia* against generalist predators like *Camponotus crassus*. It was also observed that the chemistry of defence was located on the surface of the caterpillars because the ants rejected them after a short contact. Because they are located on the external surface of the body, cuticular lipids (CLs) may be involved in chemical communication, both inter and intraspecific. It was verified that the CL profile of *Mechanitis polymnia* larvae and *Solanum tabacifolium* leaves is almost identical unlike for other Ithomiinae examined. Live larvae of *Mechanitis polymnia* were not killed by *Camponotus crassus* which also did not eat dead larvae. On the other hand other Ithomiinae larvae were killed and preyed upon by *Camponotus crassus*. Two other experiments showed that the similarity between the chemical profiles of CLs of *Mechanitis polymnia* and *Solanum tabacifolium* was the responsible for the defence against *Camponotus crassus*. The larvae would be chemically camouflaged on the leaves for an approaching ant that would not be able to distinguish the larvae from the leaf.

1. PREFÁCIO

Muitos estudos observaram tanto causas bióticas como abióticas de mortalidade em populações de borboletas (revisão em Ehrlich 1984). Entretanto, existem relativamente poucos estudos com relação à mortalidade de borboletas da subfamília Ithomiinae (Nymphalidae). Os poucos estudos existentes com relação à demografia de ithomiíneos se concentraram em verificar a sua dinâmica populacional (por ex. Vasconcellos-Neto 1980). Os dados de dinâmica por sua vez se concentram apenas no número de adultos não existindo dados com relação aos imaturos destes lepidópteros.

Um dos aspectos mais estudados da ecologia de borboletas são seus mecanismos de defesas químicas (revisões em Brower 1984, Trigo 2000). Em especial, para os Ithomiinae, o papel de alcalóides pirrolizidínicos na defesa dos adultos é bem estabelecido (revisão em Trigo 2000). Novamente, estes dados somente existem para adultos sendo quase nada conhecido sobre mecanismos de defesas químicas em imaturos.

Estágios imaturos da borboleta *Mechanitis polymnia* (Nymphalidae: Ithomiinae) possuem algum tipo de defesa química contra inimigos naturais? Esta foi a primeira e principal pergunta levantada e que se tentou responder com este projeto, sendo portanto seu principal objetivo. O primeiro passo realizado para sua verificação foi o acompanhamento de imaturos no campo. Com o acompanhamento verificou-se que a sobrevivência de ovos e pupas era baixa (~50% e ~5%, respectivamente) mas a de larvas era relativamente alta (~80%). Larvas, provavelmente, apresentavam mecanismos de defesa eficientes contra predadores. Contra parasitóides, entretanto, as defesas não pareciam tão

eficientes. Apesar da baixa mortalidade em larvas, o parasitismo era alto neste estágio de desenvolvimento, como verificado posteriormente quando da emergência dos parasitóides no estágio de pupas.

Para que fosse feito um estudo mais detalhado das possíveis defesas contra predadores com variáveis controladas, utilizou-se um sistema em laboratório usando-se a formiga *Camponotus crassus* (Formicidae: Formicinae) como um modelo de predador generalista. Observou-se que larvas vivas de *Mechanitis polymnia* eram protegidas contra as formigas, tendo baixas taxas de predação no laboratório. Para comparação, decidiu-se realizar os mesmos experimentos de mortalidade frente à *Camponotus crassus* com larvas relacionadas a *Mechanitis polymnia* mas com diferentes aspectos no estilo de vida, na tentativa de verificar se o tipo de defesa de *Mechanitis polymnia* seria relacionado a algum estilo de vida dentro dos Ithomiinae. *Mechanitis polymnia* foi a única espécie testada que apresentou defesas anti-predação eficientes contra *Camponotus crassus*. O comportamento apresentado pelas formigas frente às larvas de *Mechanitis polymnia* sugeriu que, provavelmente, o tipo de defesa usado por *Mechanitis polymnia* era algum tipo de defesa química que atuava no mecanismo de reconhecimento de presas de *Camponotus crassus*. Visto que este reconhecimento em formigas normalmente acontece através de contato superficial, o candidato mais provável de ser o responsável pela defesa seriam compostos localizados na superfície cuticular das larvas.

Lipídios cuticulares teriam algum papel nesta defesa? Esta foi a segunda principal pergunta deste projeto. A partir daí foram realizadas as análises químicas de lipídios cuticulares de insetos e plantas. Com estas análises

descobriu-se que *Mechanitis polymnia* possuía lipídios cuticulares muito semelhantes aos de sua planta hospedeira, ao contrário das outras espécies estudadas. A partir desta similaridade formulou-se a hipótese de camuflagem química, segundo a qual *Camponotus crassus* seria incapaz de reconhecer *Mechanitis polymnia* como presa devido à alta similaridade química entre seu padrão de lipídios cuticulares e o de suas plantas hospedeiras. A hipótese foi corroborada pela baixa similaridade em espécies predadas por *Camponotus crassus* e alta em espécies não predadas (*Mechanitis polymnia*). Outros experimentos foram realizados para se confirmar o papel dos lipídios neste mecanismo de defesa.

Uma investigação do grau de similaridade química de lipídios cuticulares de outros Ithomiinae (não testados contra as formigas) e suas respectivas plantas hospedeiras foi feita para identificar outras espécies em que a camuflagem química possa atuar também.

2. CAPÍTULO I

MORTALIDADE DE IMATUROS DE *MECHANITIS POLYMNIA* NO AMBIENTE NATURAL

2.1. INTRODUÇÃO

Em ecologia, uma das formas mais utilizadas na tentativa de elucidar os diversos aspectos relacionados à abundância de populações naturais de insetos fitófagos tem sido estudos utilizando dados de tabela de vida, demografia e taxas de mortalidade de imaturos de lepidópteros. Estes estudos têm implicação para teorias gerais de regulação populacional em sistemas terrestres, como a influência de fatores chave e fatores dependentes de densidade (p.e. Stiling 1988), nas relações entre estilo de vida de insetos fitófagos e sua mortalidade (Cornell & Hawkins 1995, Cornell et al. 1998) e ainda na determinação da dieta de insetos fitófagos (Moore 1989, Ohsaki & Sato 1994).

A maioria dos estudos de tabela de vida realizados tem se concentrado em organismos de interesse econômico: pragas ou possíveis controladores destas (Cornell & Hawkins 1995), sendo sua enorme maioria realizada em ambientes temperados e cultivados e um pequeno número em ambientes tropicais e naturais (Cornell et al. 1998). Dados de tabela de vida para ambientes tropicais e naturais seriam úteis na elaboração de uma teoria geral de demografia de insetos fitófagos (Cornell et al. 1998). Dos poucos estudos realizados em organismos cujo interesse era simplesmente entender sua dinâmica populacional, a maioria foi feita com borboletas (Cornell & Hawkins 1995).

Os estágios imaturos de lepidópteros estão sujeitos a altas taxas de mortalidade devido a fatores bióticos e abióticos. Apesar de as condições climáticas serem consideradas um fator de mortalidade, o grau em que elas

realmente atuam como causa direta de mortalidade em populações de borboletas, ao invés de influenciarem a disponibilidade de recursos, fecundidade e outros fatores bióticos, é desconhecido (Ehrlich 1984). Fatores bióticos como disponibilidade de plantas hospedeiras ou fontes de alimentação dos adultos, predação e parasitismo são causas bem conhecidas de flutuações em populações de borboletas (Ehrlich 1984). Predadores que se orientam quimicamente ou através do tato, como formigas, hemípteros e aranhas ou que se orientam visualmente, como vespas, lagartos e pássaros, são responsáveis pela maior parte da predação em imaturos de borboletas (Dempster 1984). Vespas (Ichneumonidae, Brachonidae) e moscas (Tachinidae) estão entre os parasitóides mais comuns de lepidópteros (Weseloh 1993). Apesar de os imaturos se defenderem de diversas formas contra estes dois tipos de inimigos naturais, as taxas de mortalidade de ovos até estágios finais de desenvolvimento (último estágio larval, pupa) estão por volta de 80 a 90% (p.e. Dempster 1967, Zalucki & Kitching 1982, Jones et al. 1987, Kristensen 1994, de Kraker et al. 1999).

Apesar de a biologia geral (Young 1972, 1973, 1974a, b, c, 1978a, b, Young & Moffett 1979a, Drummond & Brown 1987, Freitas 1996), aspectos da ecologia (Young 1979, Vasconcellos-Neto 1980, 1986, Drummond 1986, Vasconcellos-Neto & Monteiro 1993, Freitas 1996) e biosistemática e evolução (por ex. Brown 1977, Lamas 1979, Brown & Freitas 1994) de borboletas Ithomiinae serem bastante conhecidas, pouco se sabe sobre o impacto de inimigos naturais e quais as causas de mortalidade em seus estágios imaturos (mas veja Young & Moffett 1979b).

O objetivo na realização deste capítulo foi adquirir conhecimento de taxas de mortalidade durante o desenvolvimento dos imaturos de *Mechanitis polymnia* até a eclosão dos adultos na natureza. Especificamente, identificar os estágios imaturos que mais provavelmente estariam utilizando algum tipo de defesa química contra inimigos naturais através do conhecimento das taxas de mortalidade em cada estágio e estágio de desenvolvimento. Parte dos dados obtidos com este estudo serviu de base para o esclarecimento do objetivo principal deste projeto: *Mechanitis polymnia* possui algum tipo de defesa química contra inimigos naturais?

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. ORGANISMOS ESTUDADOS

Mechanitis polymnia casabranca Haensch (Nymphalidae: Ithomiinae) é uma borboleta cujos adultos apresentam coloração aposemática, com tempo de vida longo (Vasconcellos-Neto 1980, Brown & Vasconcellos-Neto 1976). Seus adultos, principalmente os machos, se alimentam em plantas contendo alcalóides pirrolizidínicos, seqüestrando estes compostos que os protegem contra predadores (Brown 1984, 1985, 1987; Brown et al. 1991; Trigo et al. 1996a,b).

A reprodução de *Mechanitis polymnia* na região de Campinas ocorre durante a estação chuvosa, levando a um aumento populacional. Durante os secos meses de inverno (julho e agosto) os adultos param de se reproduzir. Nesta época, adultos de *Mechanitis polymnia* se agregam em "bolsões" juntamente com outras espécies de Ithomiinae. Estes "bolsões" ocorrem em

locais sombreados na floresta que permanecem úmidos durante a estação seca (Vasconcellos-Neto 1986).

Fêmeas de *Mechanitis polymnia* preferem colocar ovos em áreas mais abertas, nas bordas das florestas (Vasconcellos-Neto 1986). Suas desovas consistem de ovos agrupados (10-60) na superfície superior de folhas de várias espécies de plantas pertencentes ao gênero *Solanum* (Solanaceae); suas larvas têm comportamento gregário durante a alimentação, que acontece na superfície inferior das folhas e empupam fora da planta hospedeira (Brown 1985, Drummond & Brown 1987, Brown & Freitas 1994).

O gênero *Solanum* L. é considerado um dos maiores dentre as plantas vasculares, com mais de 1500 espécies distribuídas por todo o mundo, sendo que mais de 1000 ocorrem na América do Sul (Hunziker 1979). A este gênero pertencem espécies de grande importância econômica como, por exemplo, a batata (*Solanum tuberosum*). As espécies de *Solanum* normalmente utilizadas por *Mechanitis* são comuns em áreas de vegetação secundária e áreas abertas e perturbadas (Young & Moffett 1979b).

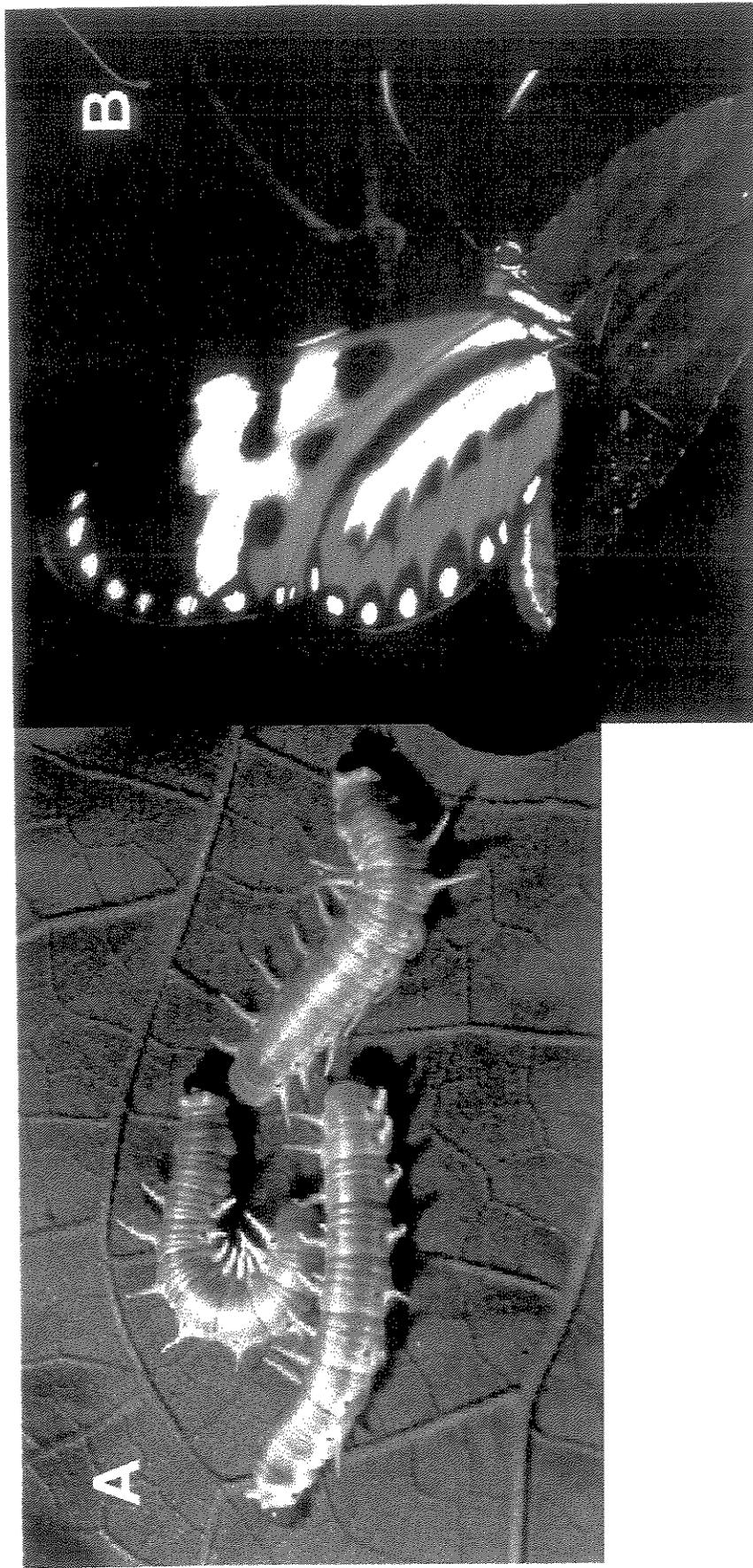


Figura 2.1. Larvas em 5^o estágio em *Solanum mauritianum* (A) e adulto (B) de *Mechanitis polymnia* fotografado na Serra do Japi, Jundiá, SP.

2.2.2. MORTALIDADE DE *MECHANITIS POLYMNIA* NO AMBIENTE NATURAL.

A mortalidade de estágios imaturos de *Mechanitis polymnia* foi observada de 13 de janeiro a 23 de abril de 1996, em duas áreas em Campinas, leste do Estado de São Paulo: 1. Mata Santa Elisa, Fazenda Santa Elisa do Instituto Agrônômico de Campinas (22°53'S, 47°05'W). Esta floresta mesofítica semidecídua de 12 hectares é circundada por áreas urbanizadas e as trilhas na floresta são ocupadas por vegetação secundária. Neste local, ocorrem duas espécies de *Solanum*, utilizadas como planta hospedeira por *Mechanitis polymnia* (*Solanum concinnum* Schidl. ex Sendter e *Solanum mauritianum* Scop.); 2. Campus da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (22°49'S, 47°05'W), situado no Distrito de Barão Geraldo em Campinas, que é uma área urbana. A espécie encontrada neste local, mais rotineiramente utilizada como planta hospedeira por *Mechanitis polymnia*, é *Solanum tabacifolium* Dunal, apesar de outras espécies de *Solanum* também estarem presentes em menor quantidade, como por exemplo *Solanum paniculatum* L..

Um total de 82 indivíduos das duas espécies de planta hospedeira de *Mechanitis polymnia* foram marcados e numerados na Mata Santa Elisa (55 *Solanum concinnum* e 27 *Solanum mauritianum*) e 5 indivíduos de *Solanum tabacifolium* foram marcados e numerados no Campus da UNICAMP. Cada planta marcada nos dois locais foi inspecionada quase que diariamente, procurando-se por larvas ou ovos de *Mechanitis polymnia*. Um total de 72 visitas, em um período de 101 dias, foram feitas para inspeção nos dois locais, sendo que cada visita durava de 40 a 150 minutos. Sempre que uma desova ou grupo de larvas era encontrado, três informações eram anotadas: o número da planta em

que o desenvolvimento estava acontecendo, o número de indivíduos imaturos e o estágio ou estágio de desenvolvimento em que o grupo se encontrava. Com este procedimento era possível saber quantos indivíduos iniciavam um determinado estágio de desenvolvimento e quantos sobreviviam até o próximo estágio para cada desova e grupo de larvas ou pupas. Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo da taxa de mortalidade durante um determinado estágio ou estágio de desenvolvimento.

Para os ovos e pupas também foi possível verificar, na maioria dos casos, se a mortalidade observada havia sido causada por predação (desaparecimento de indivíduos) ou parasitismo. Sempre que grupos de larvas, no final do desenvolvimento do 5º estágio, eram encontrados, estas eram coletadas, trazidas para o laboratório e criadas em potes plásticos até que empupassem. Como normalmente as larvas tendem a empupar na tampa dos potes, um pedaço de papel era colocado por dentro da tampa para que as larvas empupassem no papel, facilitando o sua fixação no ambiente natural. As pupas eram levadas de volta para sua área de origem e eram fixadas com fita adesiva em folhas de quaisquer plantas próximas (1 a 3 metros) à planta onde elas haviam se desenvolvido de ovos até o quinto estágio. Esta foi a única forma possível encontrada para se observar as taxas de mortalidade em um número considerável de pupas, visto que as larvas de *Mechanitis polymnia* deixam a planta hospedeira para empuparem nas imediações. Infelizmente, com este procedimento, a mortalidade total ocorrendo desde ovos até adultos recém emergidos foi subestimada, já que a mortalidade durante o 5º estágio e o estágio de pupa somente foi estimada enquanto as larvas ainda estavam no campo e

após o retorno das pupas para o campo, mas não enquanto os indivíduos em metamorfose estavam no laboratório.

A sobrevivência acumulada de ovos a adultos recém emergidos foi calculada, submetendo-se uma desova hipotética ideal de 100 ovos à mortalidade total observada para cada estágio ou estágio de desenvolvimento, até que a desova atingisse o estágio adulto. Esta sobrevivência acumulada, apesar de não permitir análises estatísticas, proporciona uma boa visualização do número relativo de indivíduos que atingem a idade adulta.

Para se comparar estatisticamente a sobrevivência ao longo do tempo entre as plantas, foram construídas curvas de sobrevivência para os imaturos de acordo com o método de Kaplan-Meier (Kleinbaum 1996). Uma vantagem deste método é que ele permite utilizar os dados de indivíduos que foram perdidos durante o acompanhamento, ou seja, que não se sabe a data de morte, mas que se sabe que sobreviveu até o período anterior a ser perdido. Estes indivíduos serão chamados de “censored” daqui por diante, e os indivíduos com a data de morte conhecida de “complete”. O tempo de sobrevivência utilizado foi o de quando a desova era encontrada até o momento em que todos os indivíduos daquela desova estavam mortos. Utilizou-se como unidade amostral a desova e não o indivíduo, porque indivíduos em uma mesma desova não podem ser considerados independentes entre si (Moore 1987). Quando se agrupam indivíduos de diferentes desovas está se presumindo que o destino destes indivíduos é independente, resultando em tamanhos amostrais artificialmente aumentados, como também potencializando estimativas erradas de mortalidade (Moore 1989). Para esta análise consideraram-se apenas desovas que foram encontradas ainda

no estágio de ovos. O acompanhamento de uma desova foi dado como terminado quando esta atingia o 5º estágio de desenvolvimento, visto que após este período as desovas eram trazidas para o laboratório e outros fatores além da mortalidade natural do campo estavam influenciando a sua sobrevivência.

As curvas de sobrevivência foram comparadas pelo teste log-rank (Kleinbaum 1996). Os testes log-rank foram feitos par a par para as três plantas hospedeiras, realizando-se a correção de Bonferroni para testes seqüenciais no nível de significância dos testes (Sokal & Rohlf 1995).

Foram utilizados dados de precipitação diária obtidos junto ao Setor de Climatologia do Instituto Agronômico de Campinas, situado na própria Fazenda Santa Elisa para se realizar uma análise da influência da umidade na oviposição por *Mechanitis polymnia* na floresta secundária. Acredita-se que os dados de precipitação forneçam uma medida indireta da umidade relativa no ar. Possivelmente as fêmeas de *Mechanitis polymnia* utilizam a umidade relativa e não a precipitação como um indicador para oviposição.

Para se comparar as taxas de mortalidade observadas durante o acompanhamento de imaturos de *Mechanitis polymnia* no campo foram utilizados testes não-paramétricos visto que muitos dos dados não apresentavam normalidade e/ou homogeneidade de variâncias mesmo após as devidas transformações. Para uma maior clareza decidiu-se utilizar apenas testes não-paramétricos: o teste U de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos e o teste de Kruskal-Wallis para mais que dois grupos (Sokal & Rohlf 1995). Quando necessário, para o teste de Kruskal-Wallis, utilizou-se o método de comparações múltiplas descrito em Campos (1979).

Foi feita uma regressão linear pelo método de quadrados mínimos (Sokal & Rohlf 1995) entre a data de início do acompanhamento de uma desova (variável independente), quando encontrada no estágio de ovos, e o tempo de desenvolvimento da desova até o 5º estágio larval (variável dependente). Esta regressão testou a hipótese de que o tempo de desenvolvimento de uma desova de ovos a 5º estágio é uma função de quando (época do ano) a desova estava se desenvolvendo. Acredita-se que desovas que se desenvolvem no verão atingiriam o 5º estágio mais rapidamente que desovas que se desenvolvem mais próximas do inverno.

Foi feita também uma regressão linear pelo método de quadrados mínimos (Sokal & Rohlf 1995) entre a temperatura média durante o período de desenvolvimento (variável independente) e o tempo de desenvolvimento da desova (variável dependente). Esta regressão testou a hipótese de que o tempo de desenvolvimento em imaturos de *Mechanitis polymnia* é uma função da temperatura média durante o desenvolvimento da desova.

Uma comparação entre os tempos médios de desenvolvimento de ovos a 5º estágio larval em imaturos de *Mechanitis polymnia* se desenvolvendo em diferentes plantas hospedeiras foi feita através de ANOVA e com o teste *post hoc* de Tukey, uma vez que os dados obedeciam as premissas para análises paramétricas.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. MORTALIDADE DE *MECHANITIS POLYMNIA* NO AMBIENTE NATURAL

A. INIMIGOS NATURAIS

Vários casos de predação por inimigos naturais foram observados durante as visitas para acompanhamento de imaturos no campo. Foi observada predação em ovos por formigas do gênero *Crematogaster* e uma espécie não identificada de hemíptero. Duas espécies não identificadas de Vespoideae, formigas *Crematogaster* e o reduvídeo *Montina confusa* foram observados predando larvas; *Crematogaster* e as duas espécies de Vespoideae também foram observadas predando pupas.

Em ambas as áreas a formiga *Camponotus crassus* foi observada patrulhando as plantas hospedeiras de *Mechanitis polymnia*. Algumas vezes as formigas estavam guardando homópteros, mas nunca foi observada predação de imaturos de *Mechanitis polymnia* por estas formigas na natureza.

Imaturos coletados na floresta secundária foram criados em laboratório onde foi possível observar parasitismo em ovos, larvas e pupas. Ovos foram parasitados por vespas Scelionidae, *Telenomus* sp., como também foi observado por Monteiro (1981). Somente moscas Tachinidae foram observadas emergindo de pupas. Estas moscas são parasitóides comuns de larvas de borboletas (Weseloh 1993). Seus adultos se alimentam de soluções açucaradas de outros insetos ou de nectários de plantas (Clausen 1940). As espécies que atacam lepidópteros sempre parasitam as larvas destes, depositando ovos ou larvas diretamente sobre as lagartas ou ainda na folha nas proximidades destas (Clausen 1940).

Ocorreu um caso de canibalismo por larvas de 5^o estágio, onde uma desova foi comida, juntamente com a folha em que estava.

B. MORTALIDADE EM DIFERENTES PLANTAS HOSPEDEIRAS

Comparando a sobrevivência dos imaturos em cada estágio ou estágio entre as três plantas observadas (*Solanum concinnum* e *Solanum mauritianum* na floresta e *Solanum tabacifolium* na área urbana), foi possível verificar que a única diferença significativa entre as plantas é durante o desenvolvimento de pupas até adultos (teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; Figura 2.2). Pupas que se desenvolveram e foram colocadas próximas a *Solanum concinnum* e *Solanum mauritianum* tiveram uma sobrevivência menor do que em *Solanum tabacifolium*, sendo em *Solanum concinnum* ainda menor que em *Solanum mauritianum*.

Em *Solanum concinnum* as pupas tiveram a taxa de sobrevivência significativamente menor do que os outros estágios de sobrevivência nesta mesma planta (teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; Tabela 2.1; Figura 2.2). Os ovos, por sua vez, tiveram sobrevivência significativamente maior que as pupas mas menor que todos os estágios larvais (teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; Tabela 2.1; Figura 2.2). Os estágios larvais tiveram sobrevivência igual entre si e significativamente maior que ovos e pupas (teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; Tabela 2.1; Figura 2.2). Este resultado indicou potencialmente as larvas como sendo o estágio mais provável de utilizar defesas químicas eficientes contra inimigos naturais.

Para os imaturos de *Mechanitis polymnia* se desenvolvendo em *Solanum mauritianum* não houve diferenças significativas na sobrevivência entre quaisquer

estágios ou estádios de desenvolvimento (teste de Kruskal-Wallis; $p=0,58$; Tabela 2.1; Figura 2.2).

Em *Solanum tabacifolium* não houve diferença significativa na sobrevivência entre ovos e os estádio larvais, mas as pupas tiveram sobrevivência significativamente menor do que do 3º para o 4º estágio larval (teste de Kruskal-Wallis; $p<0,05$; Tabela 2.1; Figura 2.2).

Tabela 2.1. Sobrevivência de imaturos de *Mechanitis polymnia* em diferentes plantas hospedeiras. As colunas n indicam o número de desovas em cada estágio ou estágio de desenvolvimento. As colunas med indicam a mediana da percentagem de sobrevivência de imaturos de um estágio ou estágio de desenvolvimento ao próximo. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para a sobrevivência entre estágios e estádios em uma mesma planta hospedeira. Ver Figura 2.2 para diferenças entre plantas hospedeiras em um mesmo estágio de desenvolvimento.

Planta hospedeira	Ovos a 1 ^o		1 ^o a 2 ^o		2 ^o a 3 ^o		3 ^o a 4 ^o		4 ^o a 5 ^o		pupa a adultos	
	n	med	n	med	n	med	n	med	n	med	n	med
<i>Solanum concinnum</i>	78	38% ^a	46	83% ^b	37	100% ^b	30	90% ^b	21	96% ^b	20	0% ^c
<i>Solanum mauritianum</i>	20	74% ^a	14	63% ^a	13	78% ^a	12	86% ^a	3	88% ^a	3	8% ^a
<i>Solanum tabacifolium</i>	17	76% ^{ab}	18	90% ^{ab}	14	94% ^{ab}	12	100% ^a	11	93% ^{ab}	3	34% ^b

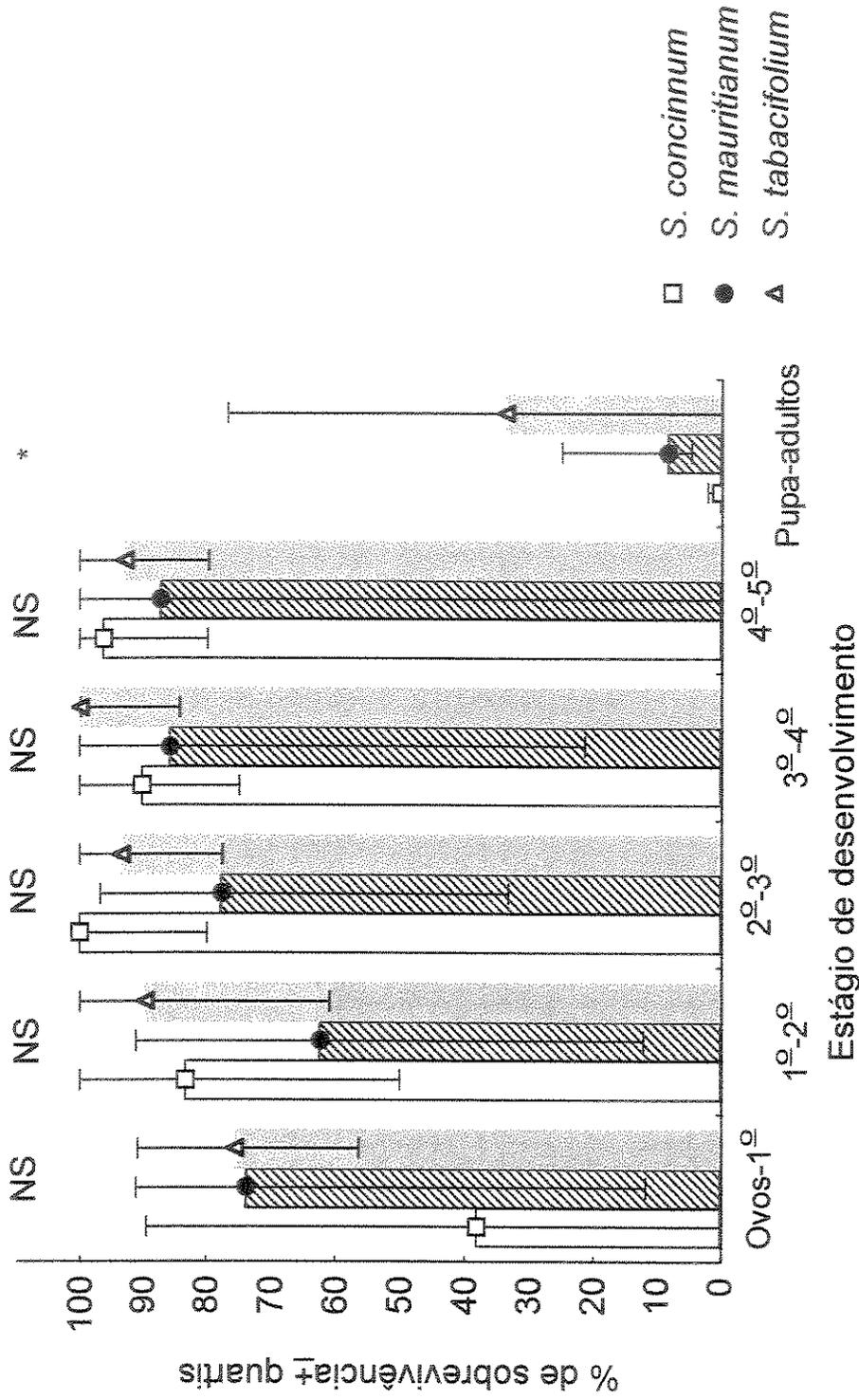


Figura 2.2. Medianas da sobrevivência de um estágio de desenvolvimento ao seguinte em imaturos de *Mechanitis polymnia* em diferentes plantas hospedeiras. As caixas indicam as medianas e as barras os quartis 25 (inferior) e 75% (superior). A notação acima das barras indica o nível de significância para diferenças entre as plantas em um mesmo estágio de desenvolvimento (NS=não significativo, * $p < 0,05$ – teste de Kruskal-Wallis). Ver Tabela 2.1 para diferenças entre estágios de desenvolvimento em uma mesma planta hospedeira.

Segundo o cálculo da sobrevivência acumulada ao longo do desenvolvimento a sobrevivência parece ser maior em imaturos se desenvolvendo em *Solanum tabacifolium* (área urbana) do que em *Solanum concinnum* e *Solanum mauritianum* (floresta secundária). Em *Solanum tabacifolium* 17% dos ovos atingem o estágio adulto, contra 1,2 e 0,9% em *Solanum mauritianum* e *Solanum concinnum*, respectivamente (Figura 2.3). As curvas de sobrevivência construídas de acordo com o método de Kaplan-Meier (Figura 2.4), demonstraram resultados semelhantes aos obtidos com a sobrevivência acumulada (Figura 2.3). As taxas de risco (“hazard rates”), que são inversamente proporcionais à sobrevivência, obtidas para as curvas de sobrevivência, estão de acordo com as percentagens de sobrevivência acumulada, sendo menores para *Solanum tabacifolium* e equivalentes para *Solanum mauritianum* e *Solanum concinnum* (Tabela 2.2).

As curvas de sobrevivência de imaturos de *Mechanitis polymnia* em *Solanum concinnum* e *Solanum mauritianum* demonstraram ser equivalentes entre si (teste log-rank; $p=0,33$; Figura 2.4) apresentando taxas de risco semelhantes (Tabela 2.2).

A curva de sobrevivência dos imaturos em *Solanum concinnum* foi significativamente diferente da curva em *Solanum tabacifolium* (teste log-rank; $p<0,01$; Figura 2.4). A taxa de risco em *Solanum concinnum* foi 8,5 vezes maior do que em *Solanum tabacifolium* (Tabela 2.2), indicando uma maior sobrevivência nesta última planta.

Entre as curvas de sobrevivência de *Solanum mauritianum* e *Solanum tabacifolium* também houve diferença significativa (teste log-rank; $p<0,01$; Figura

2.4). A taxa de risco foi 12 vezes maior em *Solanum mauritianum* do que em *Solanum tabacifolium* (Tabela 2.2), indicando novamente uma sobrevivência maior em *Solanum tabacifolium*.

Tabela 2.2. Percentagem de sobrevivência acumulada e taxas de risco ("hazard rates") para imaturos de *Mechanitis polymnia* em diferentes plantas hospedeiras.

Planta hospedeira	% de sobrevivência acumulada	Taxa de risco
<i>Solanum concinnum</i>	0,9	0,034
<i>Solanum mauritianum</i>	1,2	0,048
<i>Solanum tabacifolium</i>	17,0	0,004

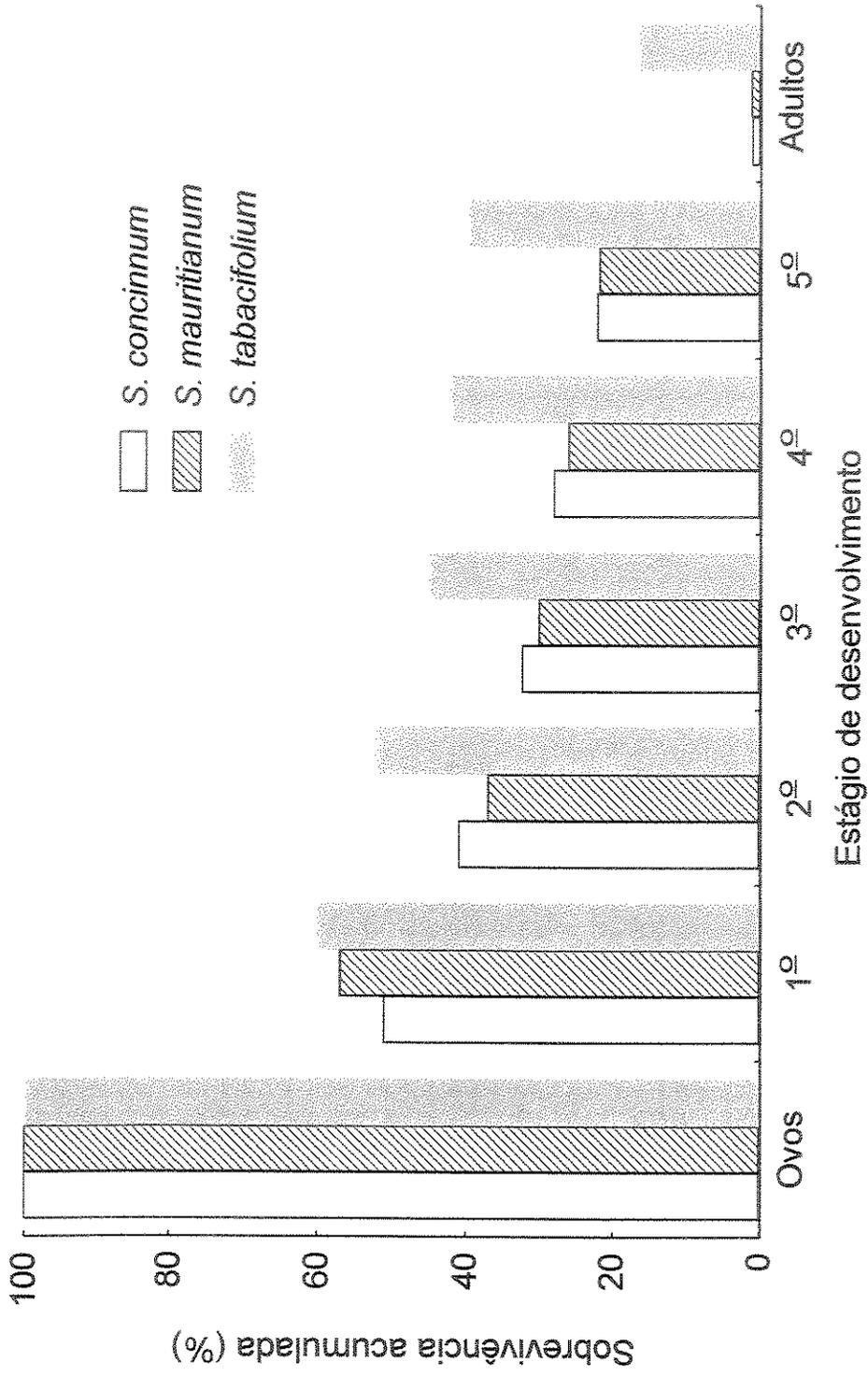


Figura 2.3. Sobrevivência acumulada calculada em *Mechanitis polymnia* de ovos a adultos recém emergidos em diferentes plantas hospedeiras.

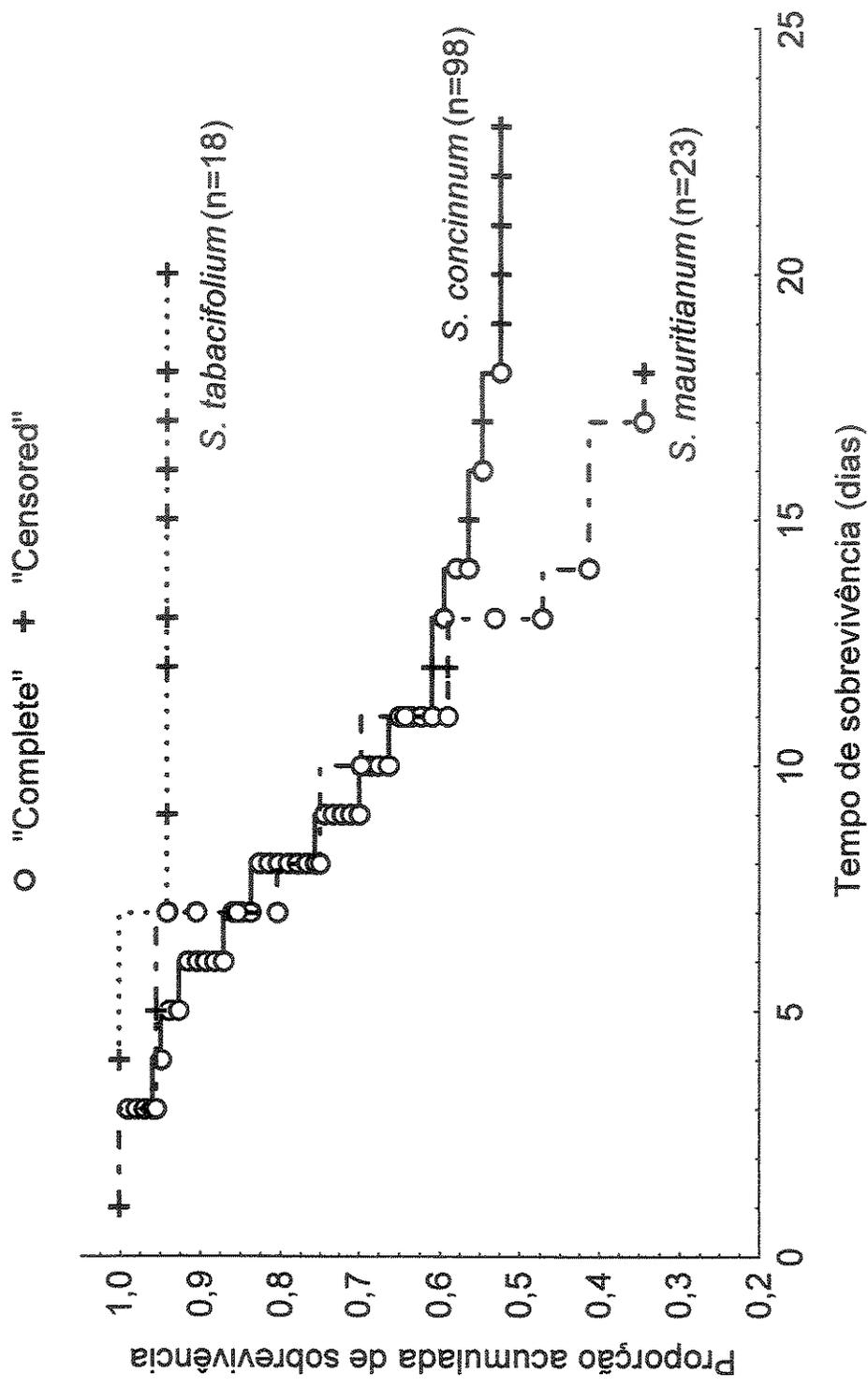


Figura 2.4. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para imaturos de *Mechanitis polynymia* se desenvolvendo em diferentes plantas hospedeiras. Ver item 2.2.2 para uma descrição de "Complete" e "Censored". Os n's entre parênteses indicam o número de desovas acompanhadas.

C. CAUSAS DE MORTALIDADE

A mortalidade de ovos em *Solanum concinnum* foi devida principalmente à predação, entretanto o parasitismo e causas desconhecidas também contribuíram sensivelmente para a mortalidade de ovos (teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; Figura 2.5). Em *Solanum mauritianum* a principal causa de mortalidade de ovos foi a predação (teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$; Figura 2.5), sendo as causas desconhecidas também importantes, mas com apenas uma desova sofrendo mortalidade causada por parasitismo. Curiosamente, nenhum caso de parasitismo ou causas desconhecidas foi observado em *Solanum tabacifolium* (área urbana), onde toda a mortalidade de ovos foi causada por predação (teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$; Figura 2.5). As causas desconhecidas de mortalidade provavelmente ocorriam por causa de chuva, já que era quando os ovos desapareciam sem deixar sinais aos quais se poderia atribuir um fator de mortalidade. Quando os ovos eram predados por formigas ou hemípteros, era possível reconhecer, a olho nu, sinais claros, como restos da parte basal do córion ou ovos sugados, respectivamente, que permaneciam na planta hospedeira.

Ovos em *Solanum concinnum* foram significativamente mais parasitados do que em *Solanum mauritianum* ou *Solanum tabacifolium* (teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,01$; Figura 3.6). A mortalidade devido à predação foi mais alta em *Solanum tabacifolium* (teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,01$; Figura 2.5). Já a mortalidade por causas desconhecidas foi mais baixa em *Solanum tabacifolium*, não apresentando nenhum caso deste tipo (teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$; Figura 2.5).

Também para as pupas foi possível a distinção entre a mortalidade causada por predação e parasitismo. Nenhuma diferença significativa na

mortalidade devido à predação ou ao parasitismo foi observada entre as três plantas hospedeiras (teste de Kruskal-Wallis; $p > 0,28$ para ambos; Figura 2.6); para cada planta hospedeira as diferenças observadas entre predação e parasitismo também não foram significativas (Mann-Whitney teste U; $p > 0,16$ para todas; Figura 2.6).

Como as pupas foram levadas para o campo em grupos, mas colocadas individualmente, podemos considerá-las também de forma individual. Analisando-se desta forma pode-se verificar diferenças marcantes entre as causas de mortalidade (Tabela 2.3). A mortalidade por predação é aparentemente semelhante entre as três plantas hospedeiras mas a taxa de parasitismo é visivelmente menor em *Solanum tabacifolium*. Isto resultou numa taxa de sobrevivência maior nesta última planta, como já havia sido verificado pelo teste estatístico realizado com os dados de grupos de pupas (Figura 2.2).

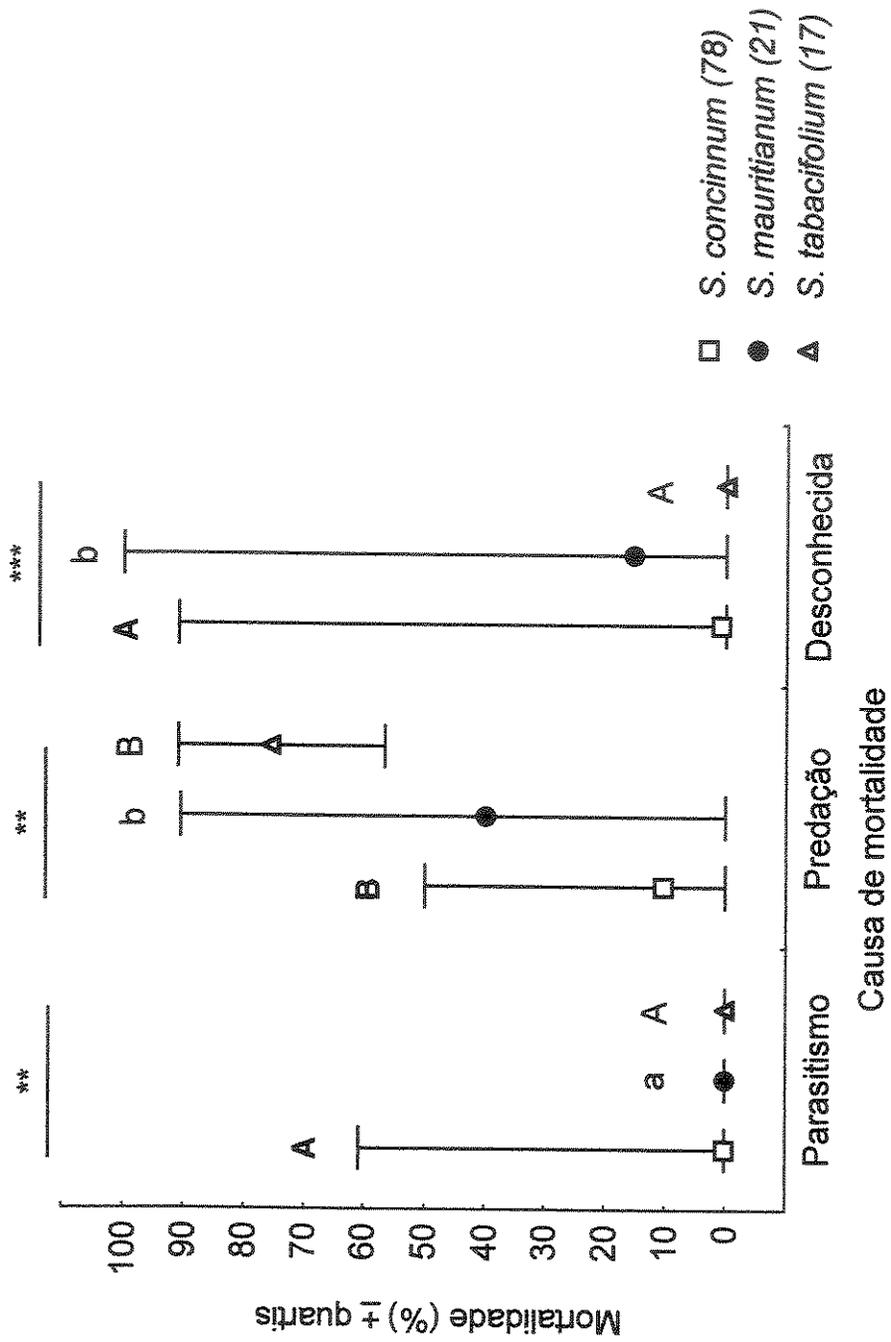


Figura 2.5. Medianas da mortalidade [e quartis 25 (inferior) e 75% (superior)] de ovos de *Mechanitis polymnia* em diferentes plantas hospedeiras. Os números entre parênteses indicam o número de desovas amostradas. A notação mais alta acima das barras indica o nível de significância para diferenças entre as plantas em uma mesma causa de mortalidade (NS=não significativo, ** p<0,01, *** p<0,001 – teste de Kruskal-Wallis). Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre causas de mortalidade em uma mesma planta hospedeira (teste de Kruskal-Wallis; p<0,05).

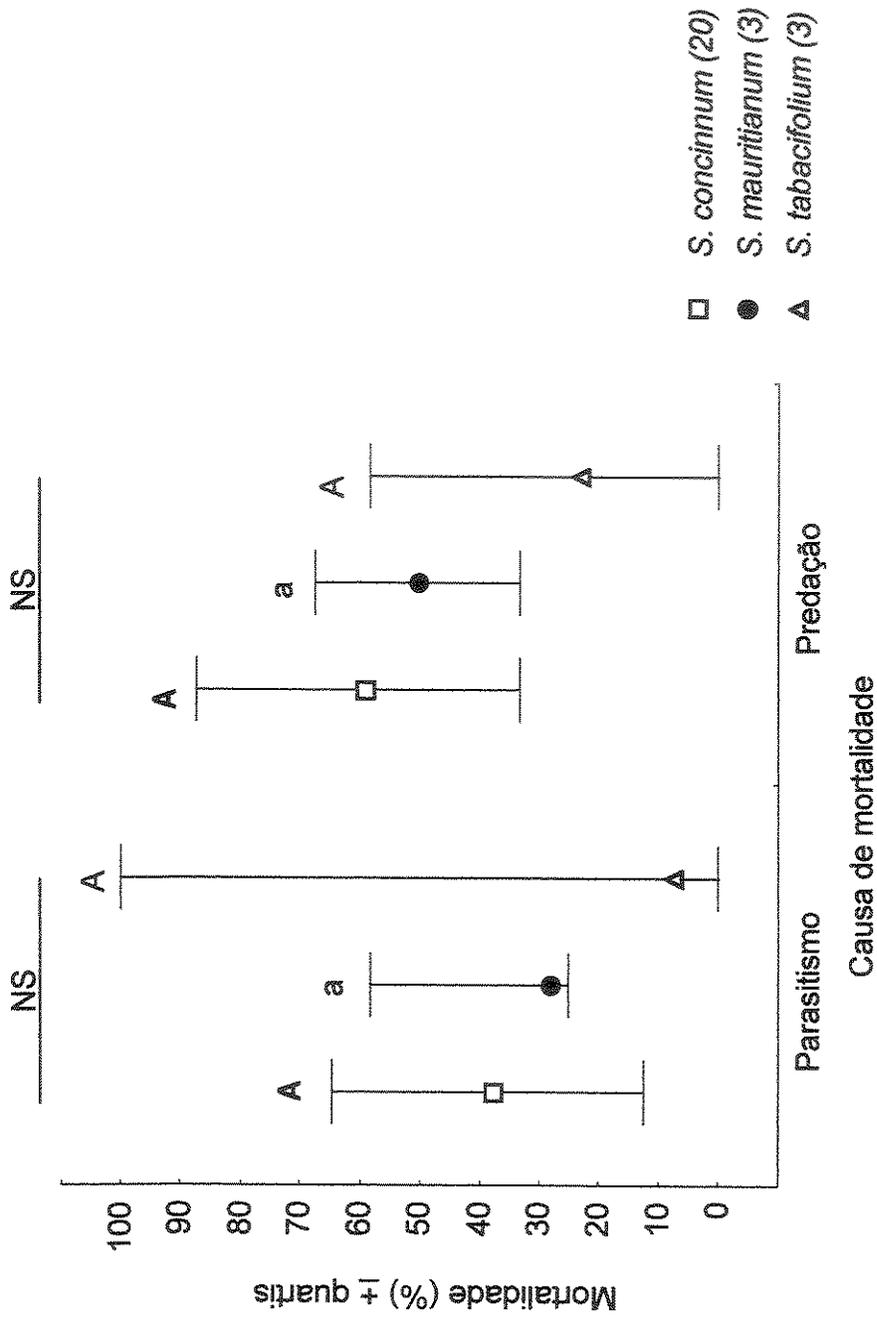


Figura 2.6. Medianas da mortalidade (e quartis 25 e 75%) de pupas de *Mechanitis polymnia* em diferentes plantas hospedeiras. Os números entre parênteses indicam o número de desovas amostradas. A notação mais alta acima das barras indica o nível de significância para diferenças entre as plantas hospedeiras em uma mesma causa de mortalidade (NS=não significativo, teste de Kruskal-Wallis). Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre causas de mortalidade em uma mesma planta hospedeira (Mann-Whitney teste U; $p < 0,05$).

Tabela 2.3. Causas de mortalidade de pupas e sobrevivência de pupas a adultos em *Mechanitis polymnia* em diferentes plantas hospedeiras.

Planta hospedeira	n de pupas	% parasitismo (Tachinidae)	% predação (desaparecimento)	% sobrevivência (adultos)
<i>Solanum concinnum</i>	229	35,8	60,7	3,5
<i>Solanum mauritianum</i>	63	33,3	58,7	8,0
<i>Solanum tabacifolium</i>	67	7,5	50,7	41,8

2.3.2. INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS

A. NA OVIPOSIÇÃO

A análise realizada ao se sobrepor o recrutamento de ovos com a pluviosidade diária mostra que existe um atraso de aproximadamente 2 dias entre um pico de pluviosidade no período e o pico de oviposição subsequente (Figura 2.7). Foram utilizados somente dados do número de ovos para a área de floresta (*Solanum concinnum* e *Solanum mauritianum*) porque os dados de pluviosidade são desta mesma área e, portanto, os dados da área urbana (*Solanum tabacifolium*) poderiam confundir a análise.

A regressão linear realizada entre a data de início do acompanhamento da desova e seu tempo de desenvolvimento foi altamente significativa (teste F; $p < 0,001$; Figura 2.8). Quanto mais próximo o inverno, maior foi o tempo de desenvolvimento dos imaturos. Entretanto, o valor do coeficiente de determinação encontrado ($r^2 = 0,5915$) indica que apenas 59,15% da variação observada no tempo de desenvolvimento pode ser atribuída à variação na data de início do acompanhamento.

B. NO DESENVOLVIMENTO

A regressão linear realizada entre a temperatura média durante o desenvolvimento da desova e seu tempo de desenvolvimento foi significativa (teste F; $p < 0,01$; Figura 2.9). Quanto menor a temperatura média durante o desenvolvimento, mais tempo os imaturos levaram para atingir o 5^o estágio larval. Entretanto, o valor do coeficiente de determinação encontrado ($r^2 = 0,4048$) indica que somente 40,48% da variação observada no tempo de desenvolvimento pode ser atribuída à variação na temperatura média durante o desenvolvimento.

Os tempos de desenvolvimento de *Mechanitis polymnia* de ovos até o 5º estágio foram significativamente diferentes, entre imaturos se desenvolvendo em *Solanum concinnum* (média = 18,7 dias) e *Solanum tabacifolium* (média = 16,3 dias) (ANOVA, teste de Tukey; $p < 0,05$; Figura 2.10), sendo maiores em *Solanum concinnum*. O tempo de desenvolvimento de imaturos em *Solanum mauritianum* (média = 17,7 dias) por sua vez não diferiu significativamente dos tempos em *Solanum concinnum* (ANOVA, teste de Tukey; $p = 0,80$) ou *Solanum tabacifolium* (ANOVA, teste de Tukey; $p = 0,70$).

A.

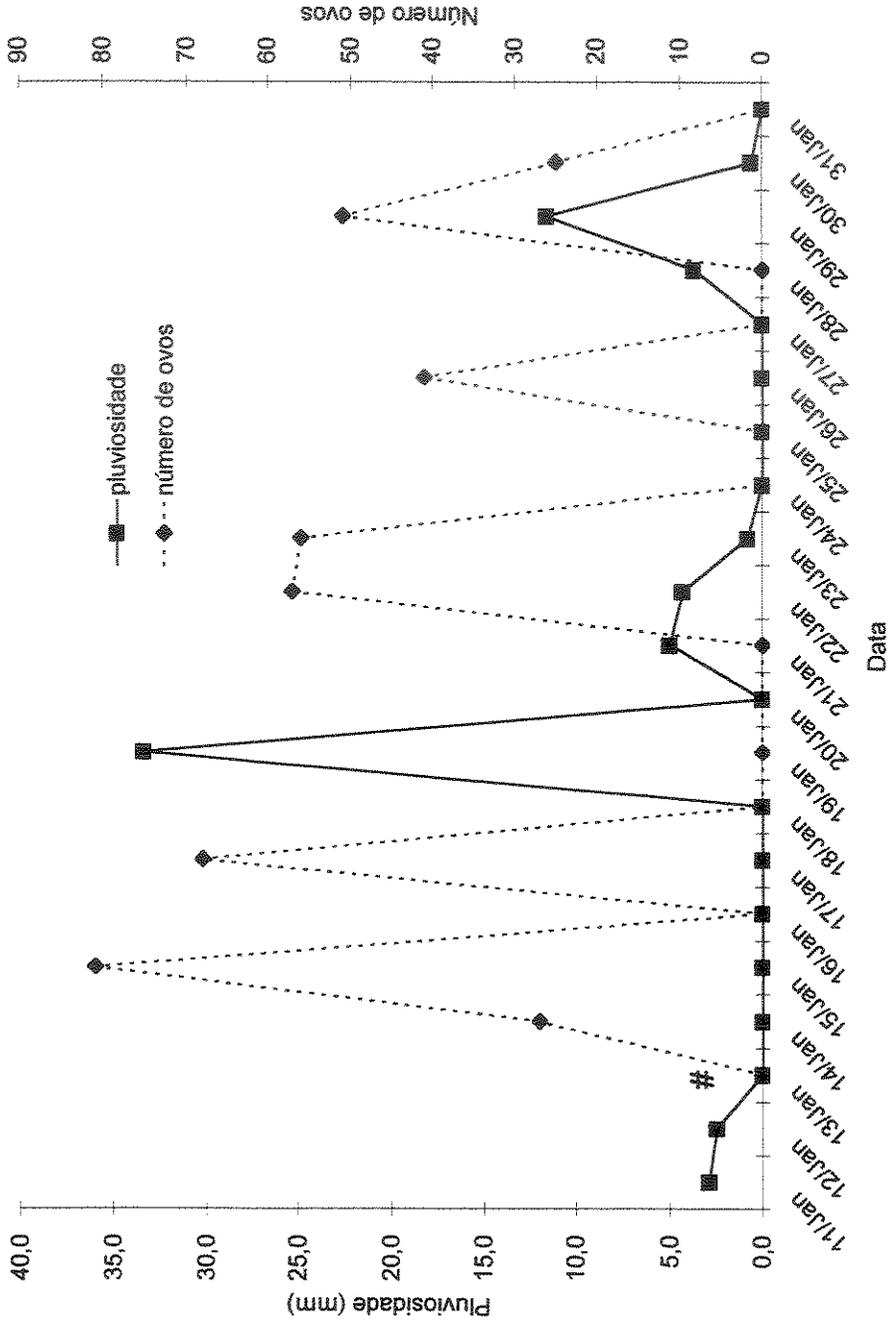


Figura 2.7. Oviposição de *Mechanitis polymnia* e pluviosidade diária na floresta secundária durante o acompanhamento realizado no campo. Cada gráfico representa uma quinzena a partir do dia 13 de Fevereiro de 1996. Na figura A, # representa a data de início do acompanhamento.

B.

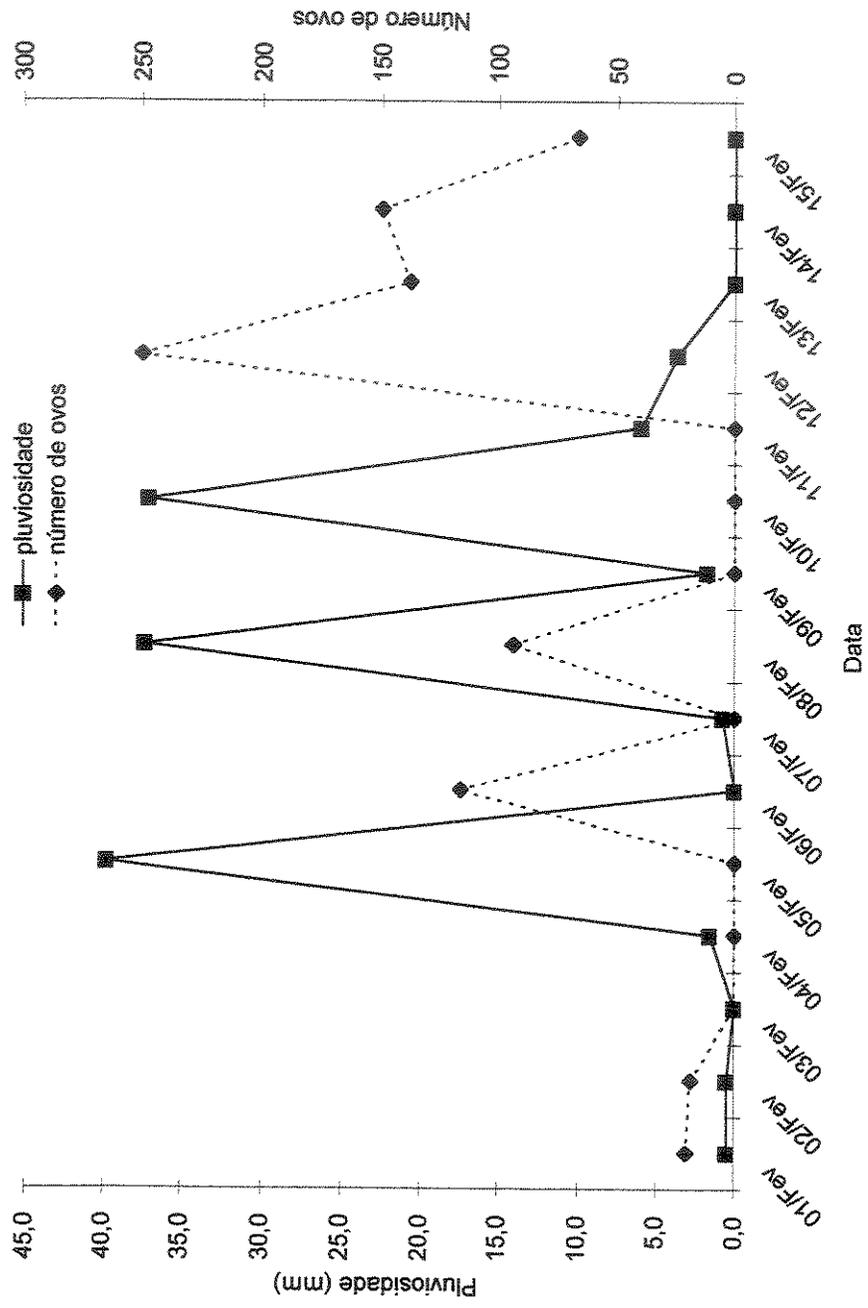


Figura 2.7. Continuação

C.

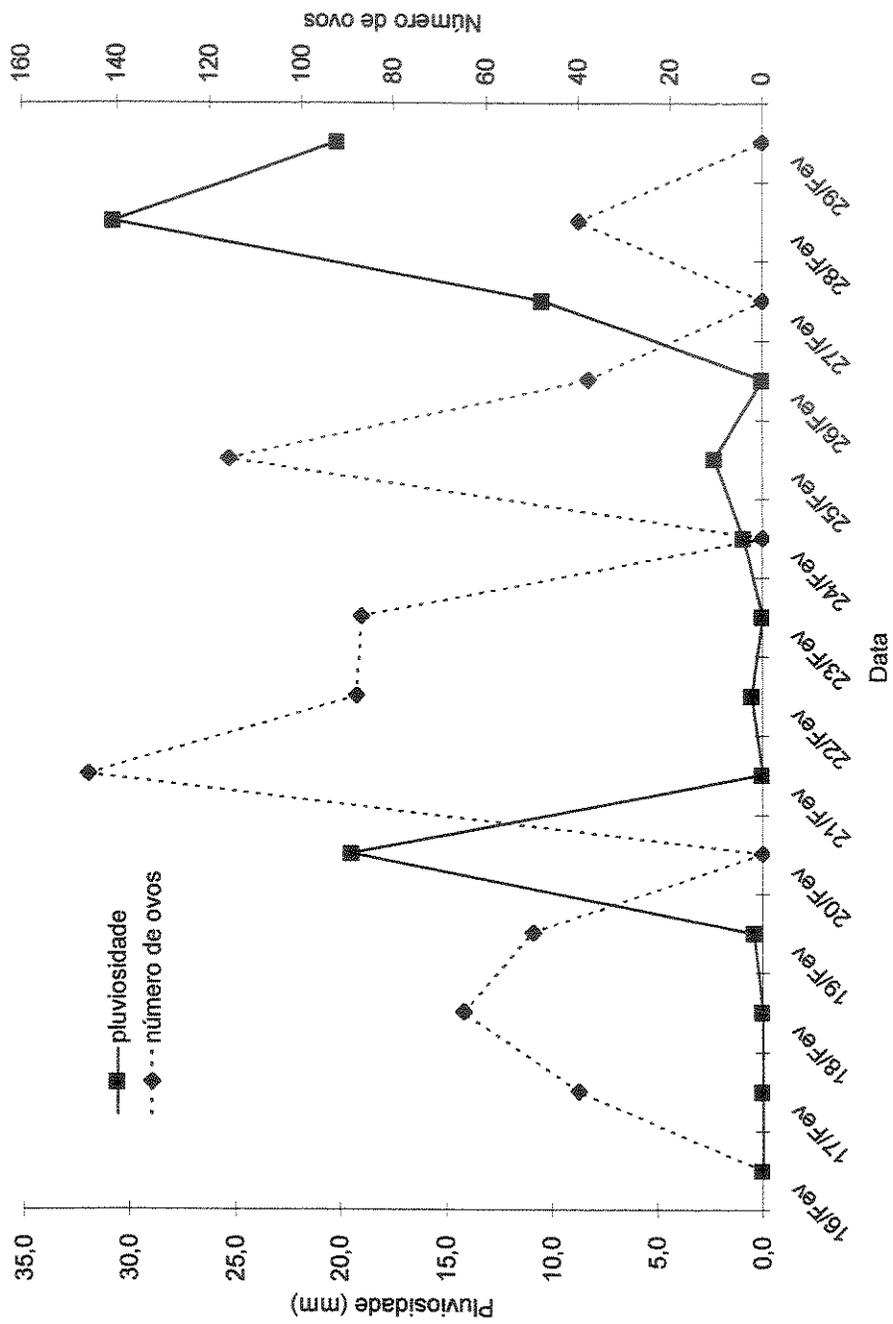


Figura 2.7. Continuação

D.

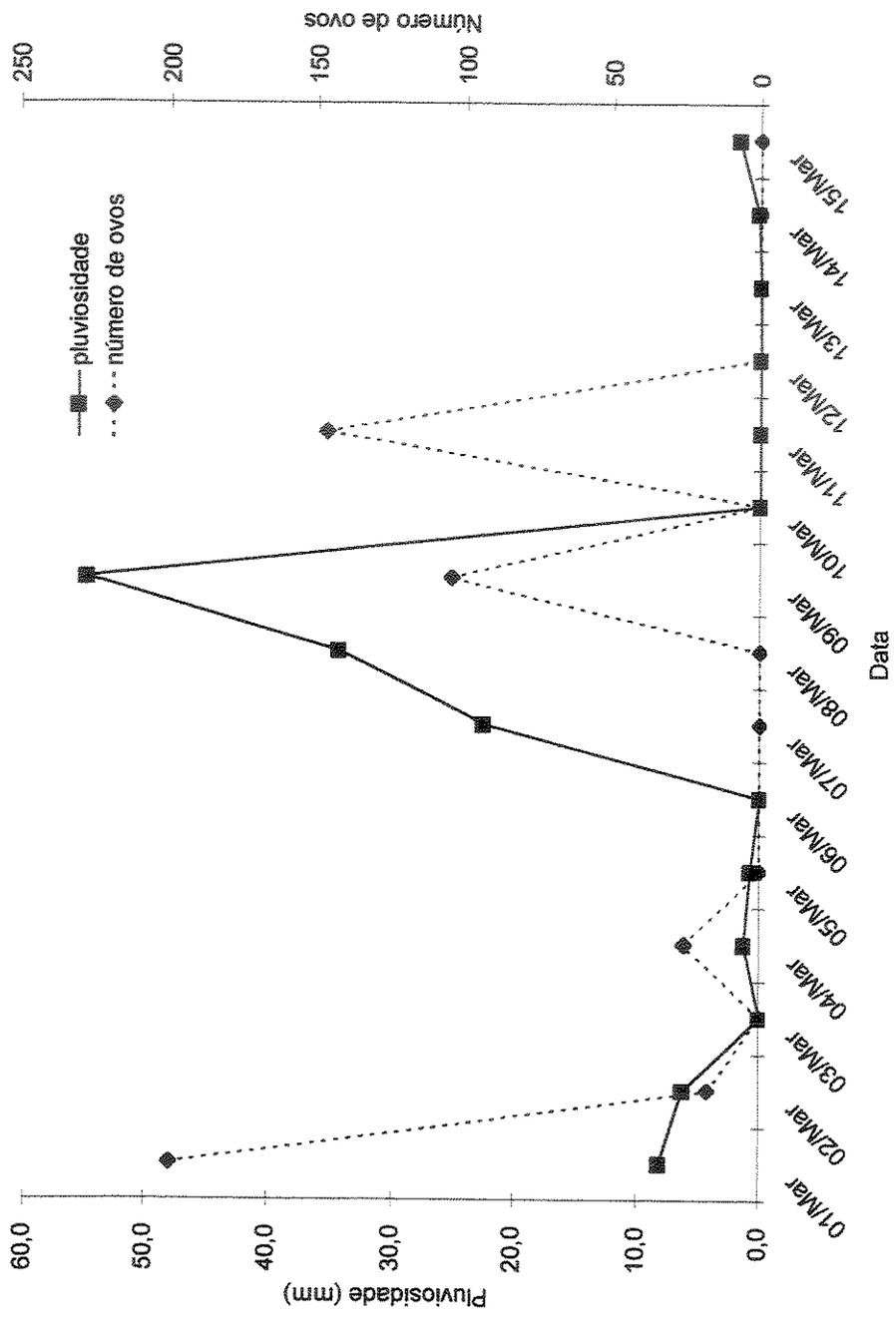


Figura 2.7. Continuação

E.

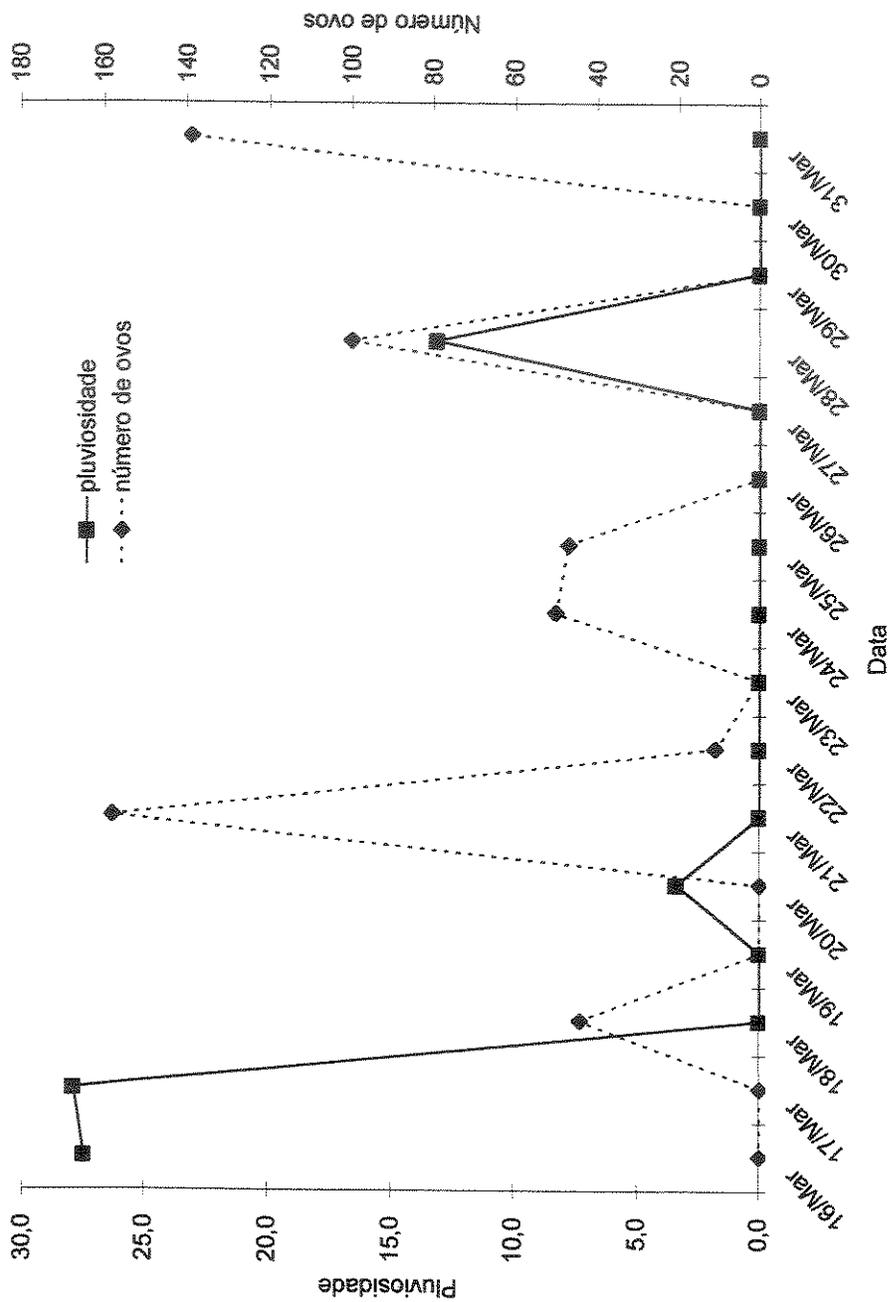


Figura 2.7. Continuação

F.

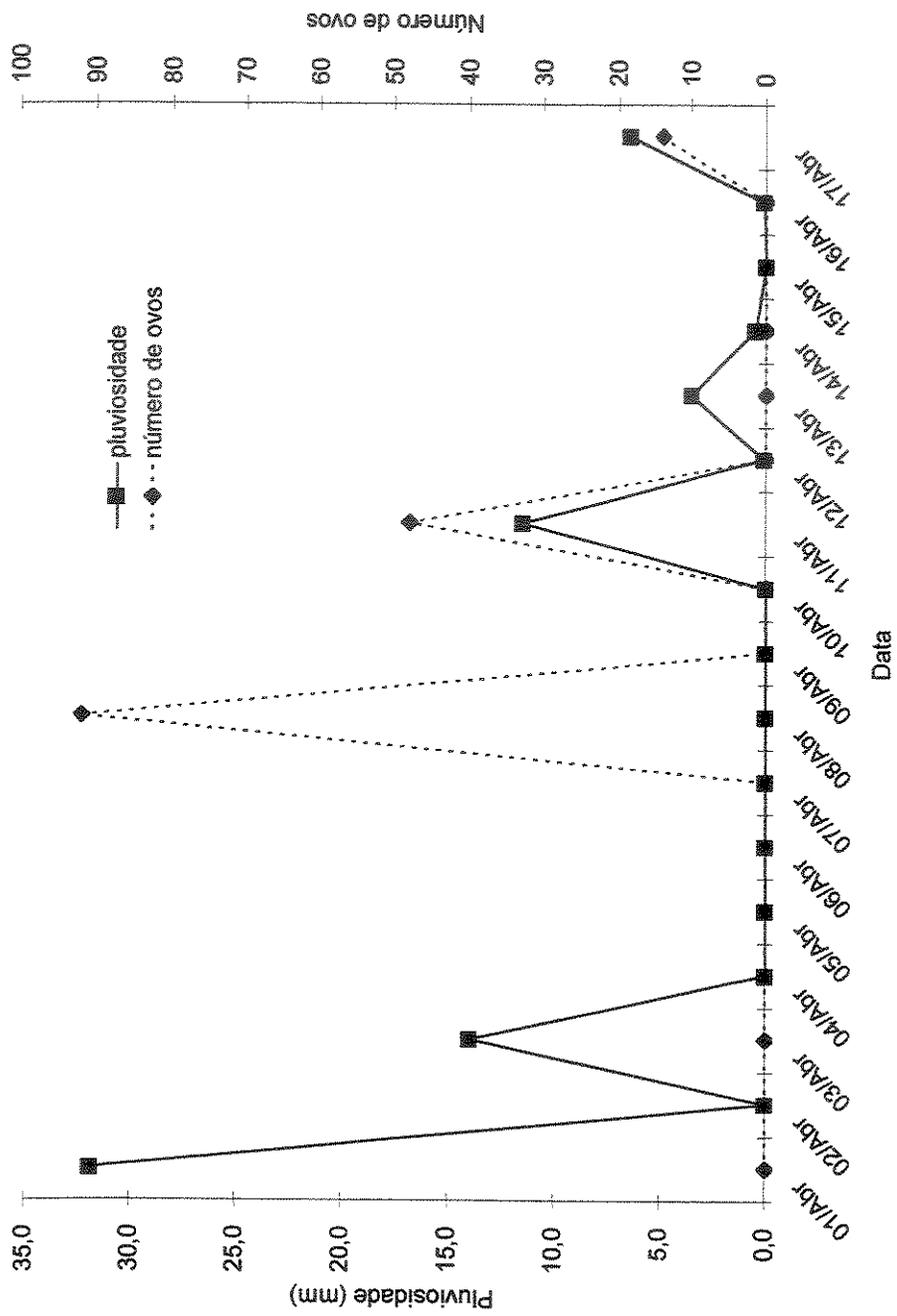


Figura 2.7. Continuação

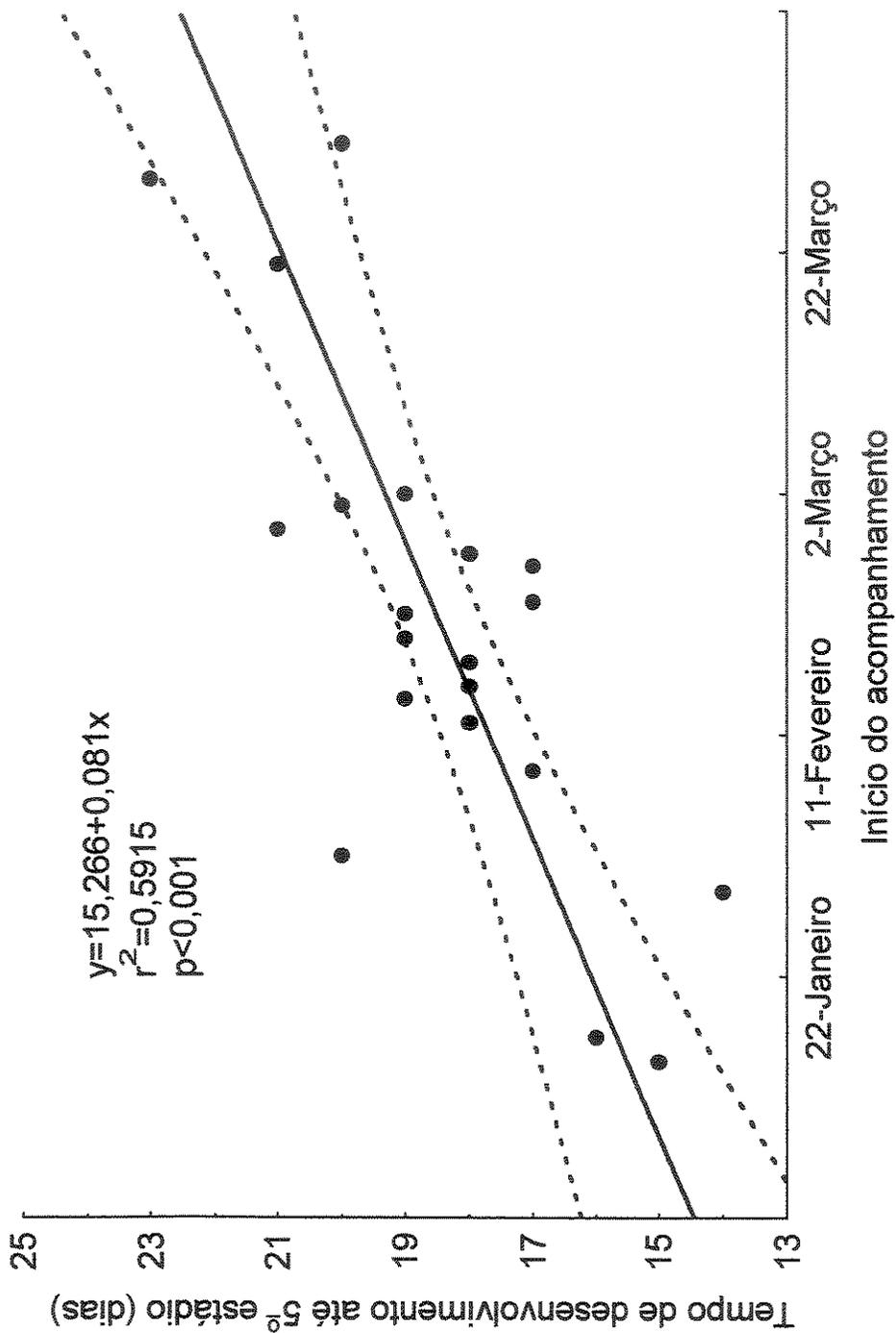


Figura 2.8. Regressão linear entre a data de início do acompanhamento de desovas de *Mechanitis polymnia* e seu tempo de desenvolvimento até o 5º estágio larval em *Solanum concinnum*. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança de 95% para as estimativas de regressão.

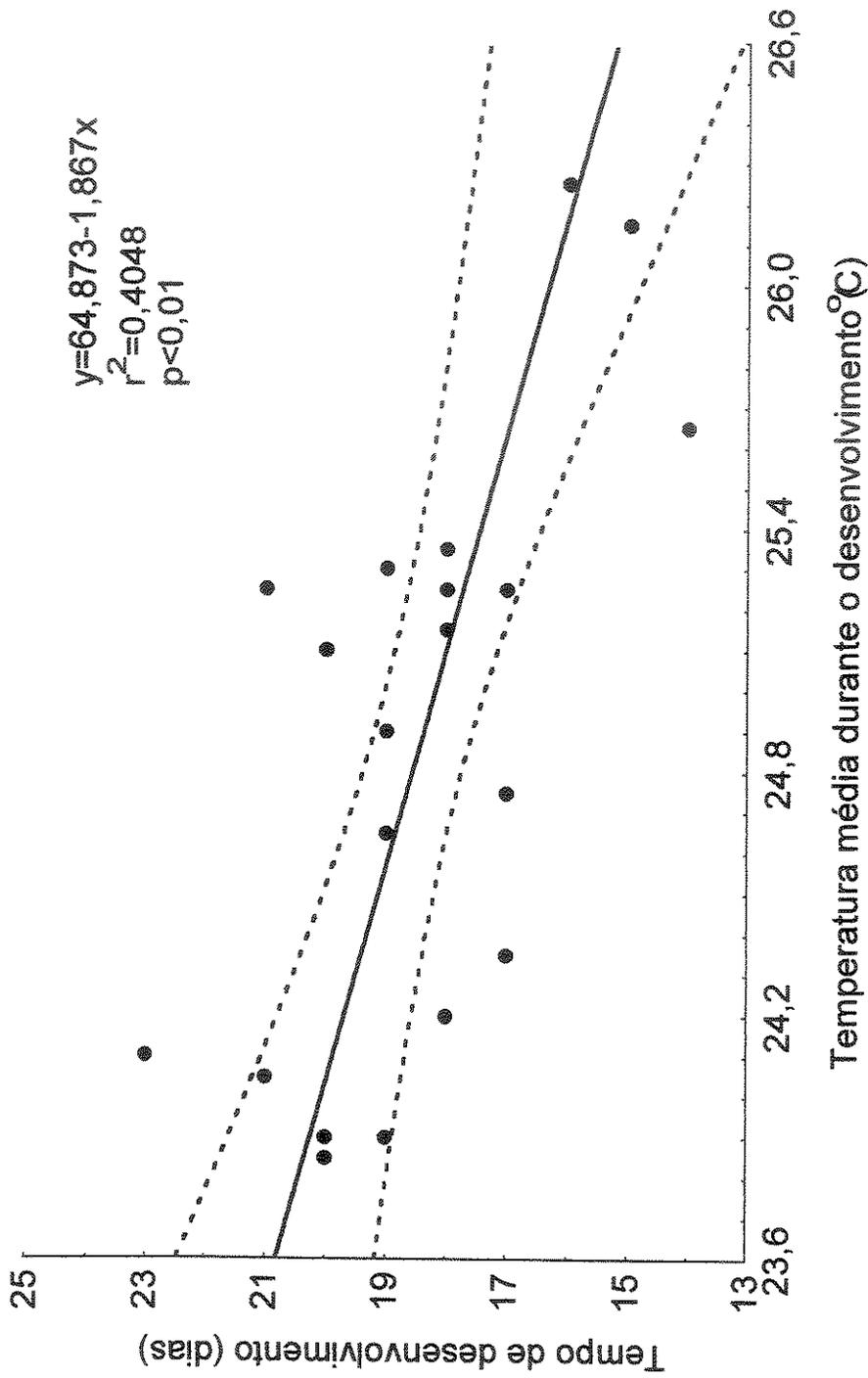


Figura 2.9. Regressão linear entre a temperatura média durante o desenvolvimento de desovas de *Mechanitis polymnia* e seu tempo de desenvolvimento até o 5º estágio larval em *Solanum concinnum*. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança de 95% para as estimativas de regressão.

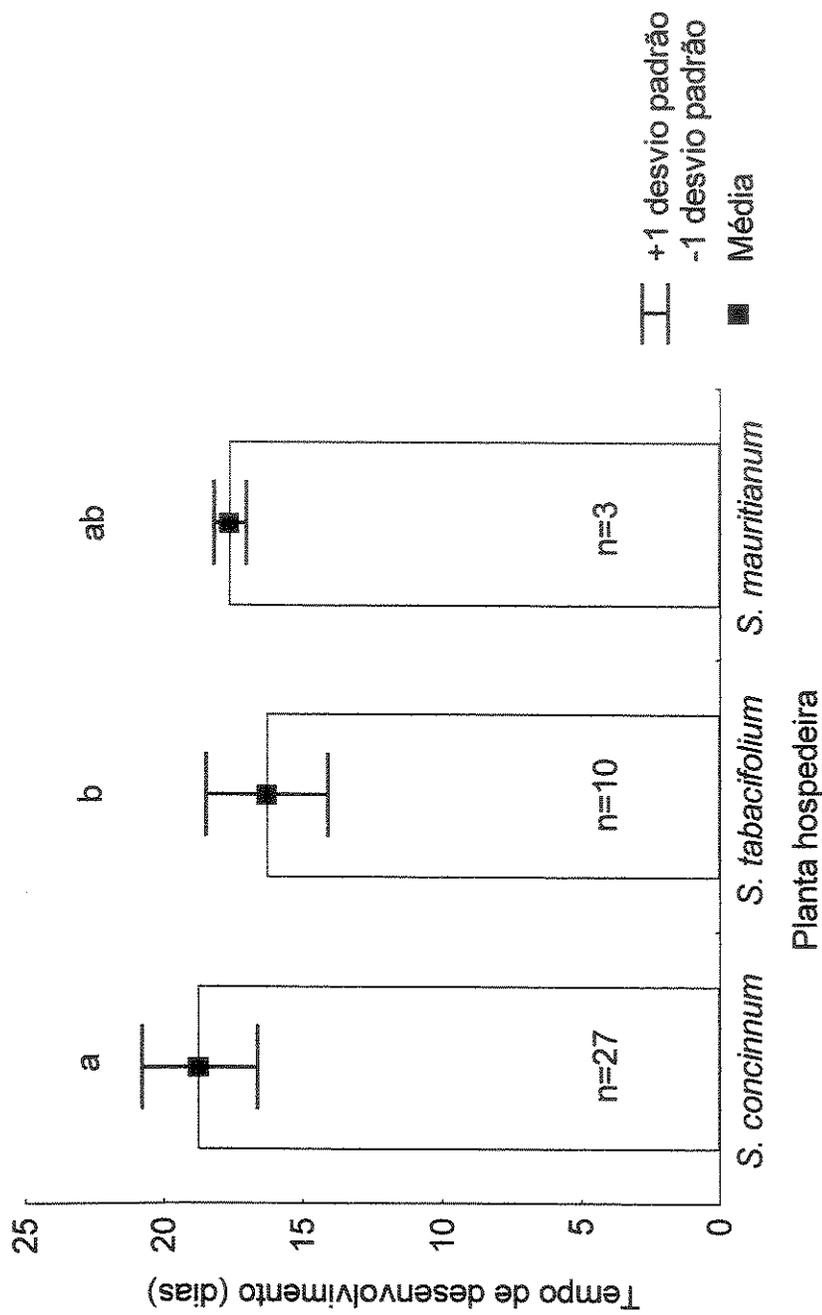


Figura 2.10. Média do tempo de desenvolvimento de imaturos de *Mechanitis polymnia* de ovos ao 5º estágio larval em diferentes plantas hospedeiras. O n indica o número de desovas amostradas. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre as plantas ($p < 0,05$; ANOVA, Teste de Tukey).

2.4. DISCUSSÃO

Inimigos naturais

Vários dos inimigos naturais diretamente observados atacando imaturos de *Mechanitis polymnia* também foram observados em outros estudos. A mortalidade em ovos causada por vespas parasitóides foi observada anteriormente para borboletas Ithomiinae (Young & Moffett 1979a, Monteiro 1981), sendo provavelmente uma causa constante de mortalidade em suas populações. Foi observada também em outros lepidópteros, como por exemplo nas borboletas *Anthocharis cardamines* (Pieridae: Pierinae) (Courtney & Duggan 1983) e *Heliconius ethilla* (Nymphalidae: Heliconiinae) (Ehrlich & Gilbert 1973) e em mariposas Pyralidae (de Kraker et al. 1999). Em outras espécies, entretanto, os observadores não reportam mortalidade causada por parasitóides de ovos (p.e. *Pieris rapae* – Dempster 1967, *Danaus plexippus* e *D. chrysippus* – Zalucki & Kitching 1982, *Euphydryas editha* – Moore 1989).

Hemípteros também foram observados predando ovos de *Mechanitis isthmia* (Young & Moffett 1979a). Formigas também foram observadas predando ovos de borboletas em *Danaus plexippus* e *Danaus chrysippus* (Nymphalidae: Danainae) (Zalucki & Kitching 1982).

Novamente, Young & Moffett (1979a) e Zalucki & Kitching (1982) também observaram vespas predando larvas em estádios iniciais de *Mechanitis isthmia* na Costa Rica e larvas de *Danaus plexippus*, respectivamente. Feeny et al. (1985) e Zalucki & Kitching (1982) também observaram hemípteros predando larvas de *Papilio polyxenes* e *Danaus*, respectivamente. Formigas *Iridomyrmex* foram

observadas predando larvas de *Pieris rapae* (Pieridae: Pierinae) na Austrália (Jones 1987, Jones et al. 1987).

Campbell & Torgersen (1982) também observaram formigas (principalmente *Camponotus*) predando pupas de *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera: Tortricidae). Moore (1989) também observou um caso de predação em uma pupa por formiga em *Euphydryas editha* (Nymphalidae: Nymphalinae).

O parasitismo em pupas pode ser discutido juntamente com o parasitismo em larvas, visto que em lepidópteros o parasitismo observado em pupas é consequência de um ataque realizado em algum estágio larval. Os parasitóides vão emergir ainda das larvas ou das pupas de acordo com suas características particulares e características do hospedeiro. De forma geral, vespas (Braconidae e Ichneumonidae) emergem de larvas grandes e moscas Tachinidae de pupas (Clausen 1940). Parasitismo por moscas Tachinidae foi observado em vários outros estudos (Dempster 1967, Courtney & Duggan 1983, Feeny et al. 1985, Ohsaki & Sato 1994). *Mechanitis polymnia* não apresentou mortalidade por outros parasitóides que são bastante comuns em lepidópteros, como vespas Braconidae (Dempster 1967, Hayes 1981, Feeny et al. 1985, Jones et al. 1987, Moore 1989, Kristensen 1994, Ohsaki & Sato 1994, de Kraker et al. 1999) e Ichneumonidae (Hayes 1981, Feeny et al. 1985, de Kraker et al. 1999). Um mecanismo de defesa que *Mechanitis polymnia* poderia apresentar contra as vespas parasitóides é o de *Pieris melete*: o braconídeo *Cotesia glomeratus* (= *Apanteles glomeratus*) não consegue parasitar efetivamente larvas deste pierídeo porque seus ovos são mortos pelo sistema imunológico de defesa do hospedeiro (Ohsaki & Sato 1994). O estudo realizado por Young & Moffett (1979a) também não observou

parasitismo por vespas Braconidae ou Ichneumonidae. É necessário ressaltar que nem este trabalho ou o de Young & Moffett (1979a) foram planejados para verificar este tipo de mortalidade. Larvas parasitadas por vespas poderiam morrer quando da eclosão dos parasitóides, caírem ao chão e nunca serem percebidas, sendo computadas como desaparecimento (predação neste caso). Ao menos neste trabalho, isto é improvável, visto que em 4 anos de criação em laboratório de larvas de *Mechanitis polymnia* coletadas no campo, nunca foi observado este tipo de parasitismo.

Outros predadores observados em estudos com lepidópteros, não registrados neste trabalho, mas que eventualmente poderiam ser causadores de mortalidade em imaturos de *Mechanitis polymnia*, incluem: aranhas (Dempster 1967, Young & Moffett 1979a, Zalucki & Kitching 1982, Feeny et al. 1985, Jones et al. 1987); outros herbívoros maiores (Moore 1989); outras lagartas de lepidópteros (Courtney & Duggan 1983); joaninhas, baratas (Zalucki & Kitching 1982); Carabidae, Anthocoridae, larvas de Neuroptera, larvas de Syrphidae, opiliões (Dempster 1967). Este último estudo (Dempster 1967) identificou uma riqueza relativamente grande de predadores (seis grandes grupos) quando comparado a outros estudos (em geral dois ou três). Isto não necessariamente significa que as populações de *Pieris rapae* estudadas estejam realmente sofrendo mortalidade devido a um maior número de tipos de predadores que outras borboletas estudadas. Dempster (1967) utilizou técnicas imunológicas contra todos os potenciais predadores coletados sistematicamente por diferentes métodos na área de estudo, atingindo assim uma ampla amostragem. Nos outros estudos aqui analisados, inclusive esta dissertação, apenas a observação direta foi utilizada

para a identificação de inimigos naturais. Jones (1987) ressalta o fato de que as técnicas utilizadas por Dempster (1967) não seriam muito eficientes quando se trata de predação por insetos sociais. Neste caso, muitos indivíduos podem estar envolvidos em um único ataque ou nem sequer se alimentaram da presa mas somente a levaram de volta para o ninho, o que não é suficiente para se obter uma resposta no teste imunológico, causando uma estimativa errada quanto à identificação dos predadores.

Seria altamente especulativa qualquer discussão em termos da importância desta ou daquela causa específica de mortalidade tanto em ovos como em larvas e pupas. A maior parte dos trabalhos realizados não são planejados para identificar ou o sistema não permite a identificação de causas específicas de mortalidade, ocasionando a atribuição de grande parte da mortalidade a causas desconhecidas (p.e. Dempster 1967, Moore 1989).

Mortalidade em diferentes plantas hospedeiras

A sobrevivência acumulada calculada desde ovos até adultos, provavelmente está sendo superestimada, já que do momento em que as larvas de 5º estágio eram retiradas do campo até o momento em que as pupas eram retornadas, cada indivíduo ficava, aproximadamente, três dias no ambiente seguro do laboratório sem sofrer causas naturais de mortalidade. A sobrevivência superestimada até adultos é um fator comum a praticamente todos os trabalhos que tentam verificar a mortalidade durante todo o desenvolvimento dos imaturos (p.e. Moore 1989). A grande maioria dos trabalhos observa a mortalidade de parte do desenvolvimento dos imaturos, em geral larvas são trazidas para o laboratório onde observa-se somente a mortalidade devido a parasitóides em larvas ou pupas

(p.e. Dempster 1967, Zalucki & Kitching 1982, Feeny et al. 1985, Jones et al. 1987, de Kraker et al. 1999), já que a maioria dos lepidópteros apresenta dificuldades para se encontrar um número suficiente de pupas no ambiente natural. Apesar de a estratégia utilizada neste trabalho permitir um acompanhamento que reflete melhor as verdadeiras taxas de mortalidade na natureza ela pode também introduzir um desvio na taxa de predação das pupas retornadas ao campo: os locais em que as pupas foram colocadas no campo eram escolhidos arbitrariamente e não devem refletir as escolhas que as larvas fariam ao empuparem.

As baixas taxas de sobrevivência de ovos até adultos encontradas para *Mechanitis polymnia* nas plantas da floresta secundária (0,9% em *Solanum concinnum* e 1,2% em *Solanum mauritianum*) estão de acordo com as encontradas para outros lepidópteros. Em populações de *Pieris rapae* acompanhadas por Jones et al. (1987) a sobrevivência máxima (até que as larvas empupassem) observada em uma determinada coorte foi de 34%, considerando apenas a mortalidade por parasitismo a partir da metade do último estágio larval, quando as larvas eram levadas para o laboratório. Também em *Pieris rapae*, Dempster (1967) observou cerca de 10% de sobrevivência até que as larvas empupassem. Kristensen (1994) observou em *Pieris brassicae* uma sobrevivência de apenas 4% de ovos até pré-pupas. Zalucki & Kitching (1982) observaram uma sobrevivência de 3 a 8% de ovos a larvas de último estágio em borboletas *Danaus plexippus* e *Danaus chrysippus*. Hayes (1981) observou uma sobrevivência de 0,5 a 2,9% de ovos a adultos em borboletas *Colias alexandra* (larvas de último estágio eram coletadas e criadas em laboratório até a eclosão dos adultos).

Young (1978c) observou uma sobrevivência de 23 a 31% de ovos a larvas de 3º estágio (5 no total) em borboletas *Heliconius cydno galanthus* e *Heliconius hecale*.

Moore (1989) trabalhando com *Euphydryas editha* observou uma sobrevivência de 0,2 a 16,6% de ovos a adultos. Neste último trabalho as pupas resultantes de larvas de último estágio coletadas eram retornadas ao campo, onde permaneciam durante seis dias, quando eram novamente coletadas e levadas ao laboratório. Desta forma, Moore (1989) conseguiu verificar a mortalidade de forma semelhante à verificada neste trabalho com *Mechanitis polymnia*. O trabalho de Moore (1989) pode ter superestimado um pouco mais a sobrevivência para *Euphydryas editha* do que a que foi estimada para *Mechanitis polymnia* porque as pupas ficavam de 1 a 4 dias no laboratório depois de terem sido deixadas no campo, além do tempo que as larvas trazidas do campo ficavam no laboratório (não há referência quanto a este tempo no trabalho). No caso das larvas de *Mechanitis polymnia* as larvas permaneciam apenas cerca de 3 dias no laboratório antes de serem retornadas ao campo, não sendo coletadas de novo, como foi feito por Moore (1989).

É interessante ressaltar que estas oito espécies citadas acima (*Pieris rapae*, *Pieris brassicae*, *Danaus plexippus*, *Danaus chrysippus*, *Colias alexandra*, *Euphydryas editha*, *Heliconius cydno galanthus* e *Heliconius hecale*) são consideradas impalatáveis (revisões em Brower 1984, Trigo 2000).

Feeny et al. (1985) trabalhando com *Papilio polyxenes* (Papilionidae) observaram uma sobrevivência de 6,4% de larvas de 1º estágio a adultos (larvas de último estágio eram coletadas e criadas em laboratório até a eclosão dos adultos). Trabalhando com mariposas praga de arroz nas Filipinas, de Kraker et

al. (1999) observaram uma sobrevivência de 3 a 30% de ovos até larvas de último estágio. As quatro espécies citadas acima (*Papilio polyxenes* e três mariposas) são consideradas de baixa ou nenhuma impalatabilidade e também apresentam baixas taxas de sobrevivência, como as espécies de alta impalatabilidade. Percebe-se que a impalatabilidade sozinha não deve ser utilizada para se fazer previsões de taxas de mortalidade no campo. Por outro lado, pode-se também questionar muitas vezes a atribuição de impalatabilidade a determinadas espécies apenas baseadas em experimentos em laboratório ou verificações de seqüestro de substâncias supostamente de defesa.

As taxas de sobrevivência em ovos de 34% em *Solanum concinnum* e de 78% em *Solanum mauritianum*, apesar de não diferirem estatisticamente, podem indicar tendências de mortalidade diferencial nas duas plantas hospedeiras. Moore (1989) também encontrou sobrevivência diferenciada em ovos de *Euphydryas editha* em duas plantas hospedeiras: de 42 a 69% em *Collinsia torreyi* e de 35 a 49% em *Pedicularis semibarbata* (ambas Scrophulariaceae). As diferenças na mortalidade de ovos, geralmente, não podem ser explicadas por fatores como impalatabilidade adquirida devido à planta hospedeira, como pode ser o caso em larvas. Moore (1989) explicou a diferença observada, baseando-se no fato de que a utilização de *Collinsia torreyi* por *Euphydryas editha* é mais recente do que de *Pedicularis semibarbata*. Este fato levaria a uma maior quantidade de inimigos naturais associados a *Pedicularis semibarbata* causando uma maior mortalidade de ovos. Em *Mechanitis polymnia* o tempo de associação com *Solanum concinnum* e *Solanum mauritianum* é provavelmente semelhante e não deve ser o causador da diferença observada. Outros fatores como diferenças

na arquitetura das plantas poderiam estar relacionados à mortalidade diferencial. *Solanum concinnum* possui folhas menores (\pm 5cm de comprimento) e mais pilosas e um crescimento mais ramificado do que *Solanum mauritianum* cujas folhas são maiores (\pm 20cm de comprimento) e menos pilosas e cresce mais verticalmente sem muitas ramificações. Diferentes causas de mortalidade relacionadas às plantas hospedeiras também poderiam causar diferenças na sobrevivência de ovos (ver discussão abaixo – *Causas de mortalidade*).

As altas taxas de sobrevivência em 1º (63 e 83% em *Solanum mauritianum* e *Solanum concinnum*, respectivamente) e 2º (78 e 100% em *Solanum mauritianum* e *Solanum concinnum*, respectivamente) estádios larvais de *Mechanitis polymnia* observadas neste trabalho estão entre as mais altas normalmente verificadas para lepidópteros em sistemas naturais. Young & Moffett (1979a), trabalhando com *Mechanitis isthmia*, observaram uma sobrevivência de apenas 8% de larvas em 1º e 2º estádios (apenas 2 de 26 grupos de larvas chegaram ao terceiro estádio). Zalucki & Kitching (1982) observaram uma sobrevivência de 40 a 58% em larvas de 1º estádio e de aproximadamente 64% em 2º estádio em borboletas *Danaus plexippus* em experimentos manipulando-se a densidade de plantas hospedeiras na Austrália. Moore (1989) observou taxas de sobrevivência de 43 a 69% em larvas de 1º estádio e de 33 a 72% em larvas de 2º estádio em borboletas *Euphydryas editha*. Feeny et al. (1985) verificaram uma sobrevivência de 41% em larvas de 1º estádio de *Papilio polyxenes* e 67% em 2º estádio. Hayes (1981) observou uma sobrevivência de 48 a 68% em larvas de 1º estádio e de 40 a 72% em 2º estádio em borboletas *Colias alexandra*. Dempster (1967) observou uma sobrevivência de 39 a 55% em larvas de 1º

estádio e de 76 a 85% em 2º estágio em borboletas *Pieris rapae*. Kristensen (1994) observou uma sobrevivência de 53 e 51% em larvas de 1º e 2º estádios, respectivamente, em borboletas *Pieris brassicae*.

Esta baixa sobrevivência em estádios iniciais de desenvolvimento larval é normalmente associada a uma maior vulnerabilidade a predadores, principalmente artrópodes (Hayes 1981, Kristensen 1994). Kristensen (1994) verificou através de experimentos com gaiolas de exclusão que predadores vertebrados têm um papel mais importante na mortalidade de larvas em estágios finais de desenvolvimento do que artrópodes. Supostamente, predadores artrópodes seriam pequenos demais para manipular larvas maiores.

A alta sobrevivência de larvas de *Mechanitis polymnia* (mínimo de 63%) pode estar associada a três fatores: (a) defesas ativas eficientes contra seus inimigos naturais, como por exemplo através de regurgitação de conteúdos intestinais e movimentação na planta hospedeira. Foi observado durante o acompanhamento no campo que a regurgitação foi eficiente na defesa contra moscas que tentavam se aproximar das larvas. Peterson et al. (1987) descreveram o uso desta estratégia de defesa por larvas de *Malacosoma americanum* (Lepidoptera: Lasiocampidae) contra formigas *Myrmica americana* (Formicidae: Myrmicinae); (b) defesas passivas eficientes contra seus principais inimigos naturais, como por exemplo camuflagem química (ver Capítulo II); (c) baixa quantidade de inimigos naturais causadores de mortalidade durante o estágio larval.

As taxas de mortalidade em pupas de *Mechanitis polymnia* foram altas, chegando a 96,5% em *Solanum concinnum*, 92,0% em *Solanum mauritianum* e

58,2% em *Solanum tabacifolium*. Podemos comparar a mortalidade em pupas com o trabalho realizado por Moore (1989). Somente este trabalho retornou as pupas ao campo (mesmo que por apenas seis dias) para que a mortalidade fosse estimada levando-se em conta a predação e não apenas o parasitismo como a maior parte dos estudos faz. Moore observou taxas de mortalidade consideravelmente mais baixas em *Euphydryas editha* do que as observadas para *Mechanitis polymnia*. Em quatro anos de estudo, a mortalidade mais alta observada foi de 42%. Neste estudo também houve uma diferença entre a mortalidade de pupas entre plantas hospedeiras. As larvas de *Euphydryas editha* utilizam uma estratégia muito diferente das larvas de *Mechanitis polymnia*, empupando abaixo do solo, de cascas de árvore ou da vegetação (Moore 1989). Moore acredita que a coloração críptica das pupas em associação aos locais em que as pupas permanecem são, ao menos em parte, responsáveis pelas baixas taxas de mortalidade.

Hayes (1981) observou uma mortalidade de apenas 20% em 10 pupas de *Colias alexandra* encontradas no campo. O tamanho da amostra é muito pequeno para se tirar quaisquer conclusões. É necessário ressaltar que diferentemente do que acontece em *Mechanitis polymnia*, os parasitóides de *Euphydryas editha* e *Colias alexandra* emergem sempre no estágio de larvas (Hayes 1981, Moore 1989) enquanto que em *Mechanitis polymnia* sempre nas pupas. Portanto deve-se comparar apenas a mortalidade causada por predadores em pupas (ver *Causas de mortalidade* abaixo).

Causas de mortalidade

A observação de que as maiores taxas de mortalidade ocorrem durante os estágios de ovo e pupa é provavelmente uma consequência do tempo maior que os indivíduos passam sem poderem se defender ativamente contra inimigos naturais nestes estágios. Young & Moffett (1979a) verificaram que desovas de populações de *Mechanitis isthimia* da Costa Rica sofriam altas taxas de mortalidade (83-100%) devido a infecções por microorganismos, parasitismo por vespas e predação por tettigonídeos e hemípteros. Edmunds (1976) encontrou um desaparecimento de 86% de ovos em *Danaus chrysippus* na África; Zalucki & Kitching (1982) observaram uma mortalidade de ovos variando de 61 a 84% em *Danaus chrysippus* e *Danaus plexippus* na Austrália. É interessante ressaltar que este alto nível de ataque por inimigos naturais nestas três espécies e também em *Mechanitis polymnia* aparentemente não deve ser influenciado pela presença de alcalóides pirrolizidínicos encontrados nos ovos de ithomiíneos e estes mesmos alcalóides e cardenolidas nos danaíneos (Trigo et al. 1996b, Reichstein et al. 1968). Entretanto é conhecido que alcalóides pirrolizidínicos protegem os ovos da mariposa *Utetheisa ornatrix* (Arctiidae) contra besouros coccinelídeos e formigas (Dussourd et al. 1988, Hare & Eisner 1993).

As taxas de mortalidade de ovos em outros lepidópteros considerados impalatáveis (revisões em Brower 1984, Trigo 2000) cujos ovos possivelmente apresentem substâncias de defesa são variáveis tanto intra como interespecificamente. Moore (1989) encontrou uma mortalidade de ovos de *Euphydryas editha*, na Califórnia, EUA, de 31 a 65% de acordo com a planta hospedeira (*Collinsia torreyi* ou *Pedicularis semibarbata*) e com a geração. Jones

et al. (1987) encontraram uma mortalidade de ovos de *Pieris rapae*, na Austrália, de 50 ou 58% de acordo com a localidade. Entretanto, Dempster (1967), trabalhando na Inglaterra também com *Pieris rapae*, encontrou uma mortalidade de ovos de apenas cerca de 10%. Na Dinamarca, Kristensen (1994) trabalhando com *Pieris brassicae*, que é muitas vezes considerada menos palatável que *Pieris rapae* (revisão em Brower 1984), encontrou mortalidades de ovos também baixas, por volta de 16%. Hayes (1981) encontrou uma mortalidade de ovos de *Colias alexandra* (Pieridae), no Colorado, EUA, de 33 a 40% de acordo com a geração. Courtney & Duggan (1983) trabalhando com *Anthocharis cardamines* (Pieridae) na Inglaterra, encontraram uma mortalidade de ovos de apenas 9,6%.

Por sua vez, lepidópteros considerados mais palatáveis apresentam taxas intermediárias de mortalidade de ovos. Feeny et al. (1985) observaram uma mortalidade de 50% em ovos de *Papilio polyxenes* em Ithaca, EUA. Trabalhando nas Filipinas, de Kraker et al. (1999) observaram uma mortalidade de 9 a 50% em ovos de três espécies de mariposas pragas de arroz, *Cnaphalocrocis medinalis*, *Marasmia patnalis* e *Marasmia exigua* (Pyrilidae). Neste sistema não era possível diferenciar os ovos das três espécies e a variação observada pode ter sido causada tanto pelas espécies quanto por diferentes locais.

Por estes dados vemos que a mortalidade em ovos pode ser um fator importante na determinação do número de imaturos se desenvolvendo, e, potencialmente, no número de adultos, tanto de espécies palatáveis quanto impalatáveis.

Para que o caminho inverso de raciocínio seja possível, ou seja, inferir o grau de impalatabilidade a partir da taxa de mortalidade ao invés de explicar a

mortalidade com base na impalatabilidade, um maior detalhamento das causas de mortalidade tem que ser atingido. Mesmo assim, suas conclusões seriam apenas especulativas necessitando de comprovação experimental.

Se a mortalidade reflete de alguma forma o grau de palatabilidade de uma determinada espécie, os ovos de *Mechanitis polymnia* poderiam ser classificados como medianamente palatáveis, com uma mortalidade de 46% dos ovos na floresta secundária (em *Solanum concinnum* e *Solanum mauritianum*) e 36% na área urbana (*Solanum tabacifolium*). Por outro lado, quando olhamos a mortalidade causada apenas por predadores percebemos que a taxa de mortalidade em *Solanum concinnum* foi de apenas 16% contra 32 e 36% em *Solanum mauritianum* e *Solanum tabacifolium*, respectivamente. Inversamente, o parasitismo foi maior em *Solanum concinnum* (17%), quase inexistente em *Solanum mauritianum* (1%) e não ocorreu em *Solanum tabacifolium*. É difícil, entretanto, discutir diferenças nas taxas de parasitismo: este somente é perceptível quando os ovos permanecem tempo suficiente na planta, se forem predados antes que o desenvolvimento do parasitóide ocorra ele não será computado, apesar de ter ocorrido. Além disto a diferença observada no parasitismo pode ser devido à presença ou não de parasitóides na área ao invés de ser causada por diferenças em palatabilidade.

Caso a variação nas taxas de predação e parasitismo entre as duas espécies de plantas que ocorriam juntamente na mata (*Solanum concinnum* e *Solanum mauritianum*) seja real, dois fatores poderiam influenciar as diferenças: (a) ocorreu competição entre predadores e parasitóides, sendo que os primeiros foram mais efetivos em *Solanum mauritianum* do que em *Solanum concinnum*; (b)

fatores abióticos nos locais em que cada planta ocorria levaram às diferenças observadas na mortalidade.

Ohsaki & Sato (1994), trabalhando no Japão, também observaram diferentes taxas de parasitismo em três espécies de *Pieris* de acordo com a planta hospedeira que estas utilizavam. Eles observaram também diferenças na taxa de parasitismo de acordo com o microambiente que a planta ocupava: larvas em plantas expostas sofriam taxas mais altas de parasitismo do que larvas em plantas escondidas pela vegetação circundante.

Moore (1989) também observou diferentes taxas de mortalidade de ovos em *Euphydryas editha* em diferentes plantas hospedeiras. Entretanto, não foram atribuídas causas à maior parte da mortalidade observada, apesar de se sugerir um papel importante para a predação neste caso.

As causas de mortalidade de pupas por parasitóides em *Mechanitis polymnia* devem ser discutidas conjuntamente com a mortalidade por parasitismo em larvas de outros lepidópteros. Isto porque em ambos os casos (parasitóides de larvas e de pupas) o parasitismo ocorre ainda no estágio larval e a diferença é apenas quando os parasitóides emergem, matando o hospedeiro (Clausen 1940). A análise de taxas de parasitismo em larvas e pupas sofrem do mesmo problema dos ovos: só é possível computar a mortalidade por parasitismo em indivíduos que não foram predados antes de os sinais do parasitismo se tornarem evidentes.

Pupas de *Mechanitis polymnia* sofreram taxas de parasitismo (de 7,5 a 35,8%) dentro da variação normalmente observada em outros estudos. Hayes (1981) observou taxas de parasitismo em larvas de *Colias alexandra* de 0 a 50% entre gerações. Moore (1989) observou taxas de parasitismo em larvas de

Euphydryas editha de 5 a 57%. Feeny et al. (1985), trabalhando com *Papilio polyxenes*, encontraram uma mortalidade devido a parasitóides, principalmente de pupas, de 10% com variação entre locais e plantas de 0 a 100%. Kristensen (1994), por outro lado, encontrou 81,9% de parasitismo em larvas de *Pieris brassicae*.

A baixa mortalidade causada por parasitóides de ovos (0%) e pupas (7,5%) na área urbana (em *Solanum tubacifolium*) pode estar relacionada a uma baixa densidade destes organismos nesta área. Ruzczyk (1986) observou uma diminuição na percentagem de pupas de *Papilio scamader* parasitadas em relação a um aumento no grau de urbanização e poluição em uma área urbana também na cidade de Campinas. Courtney & Duggan (1983) também observaram diferenças em parasitismo por moscas Tachinidae que provavelmente refletiam diferenças na complexidade estrutural dos habitats. Estes fatos podem ser uma conseqüência do alto grau de especialização comum em parasitóides (Price 1980) que faria com que uma área com baixa produtividade e heterogeneidade, como um ambiente urbano, se tornasse incapaz de suportar populações destes organismos.

Os estudos realizados por Zalucki & Kitching (1982), Feeny et al. (1985), Jones et al. (1987) e Moore (1989), que visaram investigar diretamente os efeitos de plantas hospedeiras, variação espacial e temporal, nas taxas de mortalidade de imaturos de lepidópteros deixam claro que as taxas de mortalidade podem variar muito com relação a estes fatores. Quaisquer tentativas de se encontrar padrões nas taxas de mortalidade de lepidópteros devem levar em conta estes fatores potencialmente causadores de variação. Os dados aqui apresentados para

Mechanitis polymnia são, portanto, apenas exploratórios, principalmente quando se leva em consideração a escassez de dados demográficos e de tabelas de vida de borboletas neotropicais.

Influência de fatores abióticos na oviposição

A análise dos dados de oviposição em conjunto com a pluviosidade indica que a umidade é um fator que influencia o recrutamento por parte de *Mechanitis polymnia*. A defasagem de cerca de 2 dias observada entre picos de precipitação e picos de oviposição pode ter ao menos duas explicações: (a) as fêmeas de *Mechanitis polymnia* apresentam uma resposta de oviposição defasada em relação a um pico de pluviosidade; (b) as fêmeas necessitam de períodos de tempo favorável (sem chuvas e com sol) para realizarem a oviposição. De qualquer forma, pode-se perceber que o ajuste não é perfeito, o que indica que outros fatores (além da pluviosidade ou tempo favorável) atuam nas decisões das fêmeas com relação à oviposição.

Fatores abióticos podem ter grande influência na fecundidade realizada¹ de lepidópteros (Kingsolver 1989). Courtney & Duggan (1983) mostraram que o número de ovos ovipostos por *Anthocharis cardamines* era positivamente correlacionado ao número de horas de sol durante a estação de vôo. O número de horas de sol em uma geração pode até mesmo ser o fator chave na determinação do tamanho populacional na geração seguinte (Courtney & Duggan 1983). A força de fatores abióticos como estes na oviposição, provavelmente é mais pronunciado em espécies que habitam regiões de clima imprevisível (em geral, regiões temperadas) e em espécies com tempo de vida do adulto curto.

¹ Número de ovos colocados em relação ao total que uma fêmea potencialmente poderia colocar.

Kingsolver (1985) demonstrou para *Colias alexandra* que, dada sua expectativa de vida de apenas 5 dias, em uma determinada geração até 25% das fêmeas poderiam ter até mesmo 30 horas propícias para oviposição. Enquanto que em outra geração 10% das fêmeas poderiam ter menos de 5 horas disponíveis para oviposição devido a condições desfavoráveis de tempo, como falta de sol e baixas temperaturas do ar.

Influência de fatores abióticos no desenvolvimento

A regressão linear entre o tempo de desenvolvimento de ovos até o 5º estágio larval e a data de início do acompanhamento demonstrou que há um aumento no tempo de desenvolvimento de imaturos de Janeiro a Abril. A principal explicação para este fato pode ser a relação observada entre o tempo de desenvolvimento e a temperatura média durante o desenvolvimento. A tendência de diminuição nas temperaturas médias de janeiro para abril e o conseqüente aumento nos tempos de desenvolvimento evidenciam esta explicação. Entretanto, o percentual de explicação na variação do tempo de desenvolvimento fornecido pela variação na temperatura média é baixo (40,48%) e ainda menor do que o fornecido pela data de início do acompanhamento (59,15%). Isto indica que outros fatores, também relacionados à data de início do acompanhamento, estão influenciando o tempo de desenvolvimento dos imaturos de *Mechanitis polymnia* em *Solanum concinnum*. Um possível fator de introdução de erro nos tempos de desenvolvimento observados pode ser um erro na data considerada que a desova começou a se desenvolver, pois não se sabe ao certo se a desova foi oviposta no mesmo dia em que foi encontrada pela primeira vez. Isto poderia ocorrer com mais freqüência nos dias em que não havia sido feita uma visita no dia anterior,

sendo desovas do dia da visita computadas no mesmo dia de desovas do dia anterior, em que não havia acontecido visita.

Feeny et al. (1985) demonstraram que larvas de *Papilio polyxenes* aumentavam seu tempo médio de desenvolvimento ao 4º estágio em quase 3 dias ($\approx 22\%$ do tempo total), provavelmente em resposta a fatores abióticos. Estes autores atribuem esta diferença principalmente a uma diminuição na temperatura média do ar, mas não excluem a possibilidade de uma maior pluviosidade e nebulosidade também acarretarem num aumento do tempo de desenvolvimento das larvas.

O tempo de desenvolvimento de imaturos de *Mechanitis polymnia* em *Solanum concinnum* foi menor do que em *Solanum tubacifolium*. Esta diferença pode ser devida a diferenças na qualidade nutricional entre as duas plantas hospedeiras em questão. Diferenças na qualidade nutricional afetando tempos de desenvolvimento em lepidópteros é um fenômeno bastante conhecido (p.e. Ohsaki & Sato 1994). É preciso lembrar contudo que estas duas plantas hospedeiras se encontravam em ambientes diferentes: os indivíduos de *Solanum concinnum* estavam em uma floresta secundária enquanto que os de *Solanum tubacifolium* estavam em uma área urbana. As temperaturas no interior de uma mata são claramente mais baixas do que nos arredores urbanizados. Caso seja verdadeira a relação inversa observada entre a temperatura média durante o desenvolvimento e o tempo de desenvolvimento seria esperado que este último fosse mais curto na área urbana (*Solanum tubacifolium*) que, provavelmente, apresentou temperaturas mais altas do que a floresta secundária.

3. CAPÍTULO II

LIPÍDIOS CUTICULARES NA DEFESA DE IMATUROS DE *MECHANITIS POLYMNIA*

3.1. INTRODUÇÃO

Estratégias de defesa de larvas de lepidópteros contra predadores e parasitóides incluem basicamente a cripticidade e o aposematismo; ambos os modos de vida refletem pressões seletivas de seus inimigos naturais (Stamp & Wilkens 1993; Bowers 1993). Embora ocorra um contínuo entre cripticidade e aposematismo (Stamp & Wilkens 1993), pode-se conceituar o primeiro como alguma característica que torna um organismo menos aparente para seus inimigos (p.e. aparência ou comportamento - para mais referências ver Stamp & Wilkens 1993) ou então quando seu padrão de coloração é uma amostra aleatória do pano de fundo do ambiente (Endler 1991), e aposematismo como um atributo (p.e. coloração conspícua, gregarismo, e comportamento sedentário) que adverte possíveis predadores do gosto ou odor desagradável de uma presa (ver Bowers 1993).

Mimetismo e camuflagem são formas de defesa muito utilizadas por lepidópteros contra inimigos naturais. Inicialmente estes termos são facilmente diferenciados por se aplicarem a fenômenos bem distintos, entretanto quando se deseja uma definição mais abrangente, vários problemas são percebidos (Endler 1981). Em várias situações é difícil se atribuir uma determinada situação a um ou outro fenômeno.

Uma série de autores tentaram definir de uma forma mais precisa mimetismo e camuflagem utilizando como critérios desde a origem do sinal até os efeitos da similaridade na aptidão do modelo (ver Vane-Wright 1976, Endler 1981,

Pasteur 1982, Malcolm 1990, Starrett 1993). Apesar disto uma das definições mais utilizadas e considerada das mais úteis (Malcolm 1990) é a de Vane-Wright (1976, p. 50) que diferencia os dois fenômenos de acordo com o interesse do operador no modelo que está sendo simulado e com a percepção ou não do mímico. Quando o modelo é desinteressante (ou não é percebido) para o operador o fenômeno é classificado como camuflagem (utiliza coloração críptica) e quando é do interesse (ou é percebido) do operador, como mimetismo. Em lepidópteros em geral o mimetismo está intimamente ligado ao aposematismo desde o trabalho inicial de Bates (1862). Howard et al. (1990) definiram mimetismo e camuflagem de maneira diferente para casos específicos de mimetismo e camuflagem químicos (ver revisão em Stowe 1988, Dettner & Liepert 1994). No caso de mimetismo e camuflagem químicos definidos por Howard et al. (1990) um organismo utiliza o mimetismo químico quando biosintetiza a(s) substância(s) em questão e utiliza a camuflagem química quando o organismo adquire a(s) substância(s) do modelo. A definição de Howard et al. (1990) é muito discrepante daquela mais comumente utilizada de Vane-Wright (1976) e não leva em consideração o operador que, muitas vezes, pode ser o gerador de pressão seletiva sobre o sistema causando a evolução do mecanismo de semelhança. Por este motivo utilizaremos uma definição de camuflagem química que leva em consideração os conceitos expostos por Vane-Wright (1976): um organismo está utilizando uma estratégia de camuflagem química quando as substâncias presentes no modelo, que ele adquire do modelo ou biosintetiza, o tornam desinteressante ou fazem com que ele não seja percebido pelo operador.

Mecanismos de impalatabilidade, muitas vezes associados à coloração de advertência, podem ser pêlos ou espinhos urticantes, osmetério ou outras glândulas eversíveis, regurgitação, presença de substâncias tóxicas de origem vegetal nos intestinos e seqüestro de substâncias químicas de suas plantas hospedeiras (Bowers 1993).

Em relação à defesa química em larvas, estas são, na maioria das vezes, relacionadas com estratégias de forrageamento, isto é, o que a larva come e o que ela seqüestra. Muitas vezes relacionam-se observações de palatabilidade com a riqueza de plantas utilizadas como alimento pelas borboletas em questão, constatando-se que lepidópteros considerados generalistas tendem a ser mais palatáveis que lepidópteros especialistas (Bernays 1988, Bernays & Cornelius 1989, Dyer & Floyd 1993, Dyer 1995). A partir desta constatação sugere-se que lepidópteros especialistas seqüestrem substâncias do metabolismo secundário (SMS) de plantas e tornem-se defendidos quimicamente contra predadores enquanto que generalistas excretariam as SMS obtidas em seu alimento.

É curioso notar que dos estudos envolvendo defesa química de larvas, p.e. em Lepidoptera, a grande maioria (aproximadamente 80%) mostra os efeitos deste tipo de defesa contra predadores vertebrados (Witz 1990). Muitos lepidópteros que apresentam “supostas defesas químicas”² são aposemáticos e seqüestram compostos de plantas que são ativos contra predadores vertebrados; por exemplo: *Danaus plexippus* seqüestrando cardenolidas de *Asclepias* (Brower 1984), *Tyria jacobaeae*, *Hyalurga syma* e *Tithorea harmonia* seqüestrando alcalóides pirrolizidínicos de *Senecio*, *Heliotropium* e *Prestonia*, respectivamente

² Não foram comprovadas através de bioensaios contra predadores.

(Boppré 1990, Trigo et al. 1993, 1996a), e *Battus polydamas* seqüestrando ácidos aristolóquicos de *Aristolochia* (Klitzke 1992, Brown et al. 1995, Morais 1997). Entretanto, vários autores observaram que invertebrados também são importantes predadores de larvas e estas muitas vezes são protegidas devido a substâncias seqüestradas das plantas. *Eumaeus atala* (Lycaenidae) é protegida contra formigas devido à cicasina, um alcalóide obtido de sua planta hospedeira, *Xamia floridana* (Cycadaceae) (Bowers & Larin 1989); *Uresiphita reversalis* (Pyralidae), contém alcalóides quinolizidínicos seqüestrados de sua planta hospedeira (*Genista monspessulana* - Papilionaceae), que apresentam atividade deterrente contra formigas e vespas (Montllor et al. 1991). Embora o significado das respostas de predadores invertebrados ao aposematismo de larvas não seja muito discutido, alguns estudos mostram que alguns destes predadores podem aprender e evitar subseqüentemente presas similares sem contato. Berenbaum & Miliczky (1984) mostraram que depois do primeiro encontro com o hemíptero *Oncopeltus fasciatus*, que contém cardenolidas, mantídeos aprenderam a rejeitar tanto presas palatáveis como impalatáveis que apresentassem o mesmo padrão de coloração. Formigas aprenderam a evitar larvas aposemáticas de crisomelídeos sem contato das antenas ou mandíbulas, depois do primeiro contato inicial (Dejean 1988). Entretanto Dyer & Bowers (1996) mostraram que a formiga *Formica planipiles* não tem capacidade de aprender a evitar larvas do lepidóptero *Junonia coenia* que seqüestram glicosídeos iridóides de *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae).

Larvas de insetos podem ser crípticas através de uma série de características, que incluem: (i) coloração da larva; (ii) alteração da folha da planta hospedeira, (iii) pouca movimentação; (iv) evitar disseminar pistas olfativas,

auditivas ou táteis (Stamp & Wilkens 1993). Espelie et al. (1991) sugerem a possibilidade de um herbívoro ser quimicamente críptico por ter lipídios cuticulares semelhantes aos de sua planta hospedeira.

Lipídios cuticulares de insetos têm como função primária minimizar a transpiração e proteger insetos terrestres contra dessecação, mas devido ao fato de que eles se encontram na superfície do corpo, alguns de seus componentes estão envolvidos, de várias formas, em comunicação química intra e interespecífica (Lockey 1988, Howard 1993). Em particular, a fração de hidrocarbonetos dos lipídios cuticulares, além de participarem na minimização da perda de água, mediam uma série de interações entre insetos, atuando como feromônios sexuais, mímicos na integração em colônias de insetos sociais, mímicos na exploração de mutualismos entre formigas e plantas e entre formigas e insetos (Nelson 1978, Howard & Blomquist 1982, Stowe 1988, Dettner & Liepert 1994). Em alguns casos postulou-se que hidrocarbonetos cuticulares seriam um dos principais se não o mais importante caracter químico de alguns sistemas de reconhecimento envolvendo insetos sociais (Howard et al. 1980; Howard & Blomquist 1982).

Foi demonstrado em algumas espécies de lepidópteros, que componentes polares de sua cutícula, como ácidos graxos de cadeias curtas (C6-C12) seriam efetivos contra a ação de fungos patogênicos. Este tipo de lipídios e outros também oxigenados como aldeídos e álcoois potencialmente poderiam ser efetivos na proteção contra inimigos naturais (Buckner 1993), mas este tipo de função ainda precisa ser demonstrada.

Nas borboletas da subfamília Ithomiinae, alcalóides pirrolizidínicos são responsáveis pela proteção química de adultos contra predadores (Brown 1984, 1985, 1987; Trigo 1988, 1993; Trigo & Chemin 1996; Trigo et al. 1996a; Silva 2000). Estes alcalóides apresentam duas principais síndromes de aquisição dentro desta subfamília:

1. Larvas seqüestram alcalóides pirrolizidínicos de suas plantas hospedeiras (p.e. *Prestonia* ou *Parsonsia* - Echitoideae, Apocynaceae) e transferem para os adultos através da pupa; os adultos também seqüestram os alcalóides de plantas visitadas como recurso alimentar ou simplesmente para aquisição dos mesmos (p.e. *Eupatorium*-Asteraceae e *Heliotropium*-Boraginaceae); Ithomiinae mais primitivos como *Tellervo*, *Tithorea* e *Aeria* pertencem a esta síndrome (Trigo & Brown 1990, Brown et al. 1991, Orr et al. 1996, Trigo et al. 1996a,b).
2. Larvas se alimentam de Solanaceae, família que não apresenta alcalóides pirrolizidínicos, e os adultos seqüestram estes alcalóides como na síndrome acima (Brown 1984, 1985, 1987; Brown et al. 1991; Trigo et al. 1996a,b).

Em relação às estratégias de defesas de larvas de Ithomiinae, algumas características são conhecidas, embora pouco estudadas: 1. coloração conspícua x críptica; 2. seqüestrar ou não substâncias da planta hospedeira; 3. comportamento gregário x isolado; 4. utilização ou não de regurgito como estratégia de defesa (Brown & Freitas 1994; Freitas et al. 1996; Freitas, Brown & Trigo comunicação pessoal). Algumas destas características são normalmente

encontradas em associação em uma mesma espécie como aposematismo e gregarismo (Harvey et al. 1982). Muito é discutido com relação à ordem em que estas características aparecem no tempo evolutivo e também com relação às condições que favorecem ou não o aparecimento das mesmas (p.e. Turner 1984, Sillén-Tullberg 1988).

Freitas et al. (1996) verificaram que larvas aposemáticas e gregárias do ithomiíneo *Placidula euryanassa* seqüestravam alcalóides tropânicos da solanácea *Brugmansia suaveolens*, enquanto que larvas crípticas e gregárias de *Miraleria cymothoe* se alimentando da mesma planta, excretavam totalmente estes alcalóides nas fezes.

Como existem poucos estudos sobre defesas químicas em imaturos de borboletas Ithomiinae, essa tese teve como objetivo estudar esses mecanismos de defesa em uma espécie, *Mechanitis polymnia*. Decidiu-se estudar esta espécie porque as larvas desta borboleta são abundantes na região de Campinas, apresentam características consideradas típicas de insetos impalatáveis como comportamento gregário, não-evasivo e oligofagia (Bowers 1980, Bowers 1992), entretanto sua coloração não pode ser considerada conspícua (ver Figura 2.1). Por outro lado, larvas de uma mesma espécie, inclusive de *Mechanitis polymnia*, modificam consideravelmente seu padrão de coloração durante seu desenvolvimento podendo ser consideradas tanto crípticas, quanto com coloração conspícua, dependendo do ponto de vista e referencial, tornando esse caractere subjetivo e impreciso. Larvas de *Mechanitis polymnia* se alimentam de várias espécies de *Solanum* (Solanaceae) (Brown 1985, Drummond & Brown 1987, Brown & Freitas 1994) que apresentam alcalóides esteroidais, sesquiterpenos e

possivelmente outras substâncias consideradas de defesa (Schreiber 1979, Harborne 1986). Entretanto até o presente momento somente Nash et al. (1993) encontraram alcalóides tropânicos poliidroxilados (calistegina A-3 e B-2) em adultos de *Mechanitis polymnia* seqüestrados da planta hospedeira da larva, *Solanum tuberosum*.

A partir das observações na natureza (ver Capítulo I), realizaram-se experimentos de palatabilidade em laboratório para facilitar a identificação das possíveis defesas químicas em larvas de *Mechanitis polymnia*. Outros objetivos deste capítulo incluíram:

- (a) a análise de lipídios cuticulares de lepidópteros e respectivas plantas hospedeiras;
- (b) a realização de experimentos para comprovar a eficiência do mecanismo de camuflagem química proposto;
- (c) a realização de experimentos para comprovar o papel dos lipídios cuticulares no mecanismo de camuflagem química;
- (d) a verificação dos índices de similaridade química de outros Ithomiinae e suas respectivas plantas hospedeiras.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. DEFESAS QUÍMICAS EM IMATUROS. BIOENSAIOS COM LEPIDÓPTEROS VIVOS.

O primeiro passo na tentativa de se identificar tipos de defesa química de larvas de *Mechanitis polymnia* contra predadores foi a observação em laboratório do comportamento de um predador generalista em relação a larvas vivas dessa espécie. Para se comparar as estratégias de defesas químicas dessa espécie

com a de outros Ithomiinae foram utilizadas mais três espécies de borboletas da subfamília Ithomiinae: *Methona themisto* Hübner, *Epityches eupompe* Geyer e *Placidula euryanassa* Felder & Felder, escolhidas pela disponibilidade no campo e por apresentarem estilos de vida diferentes de *Mechanitis polymnia* (Figura 3.1A), respectivamente: aposemático e solitário (Figura 3.1B); críptico e solitário (Figura 3.1C) e aposemático e gregário (Figura 3.1D).

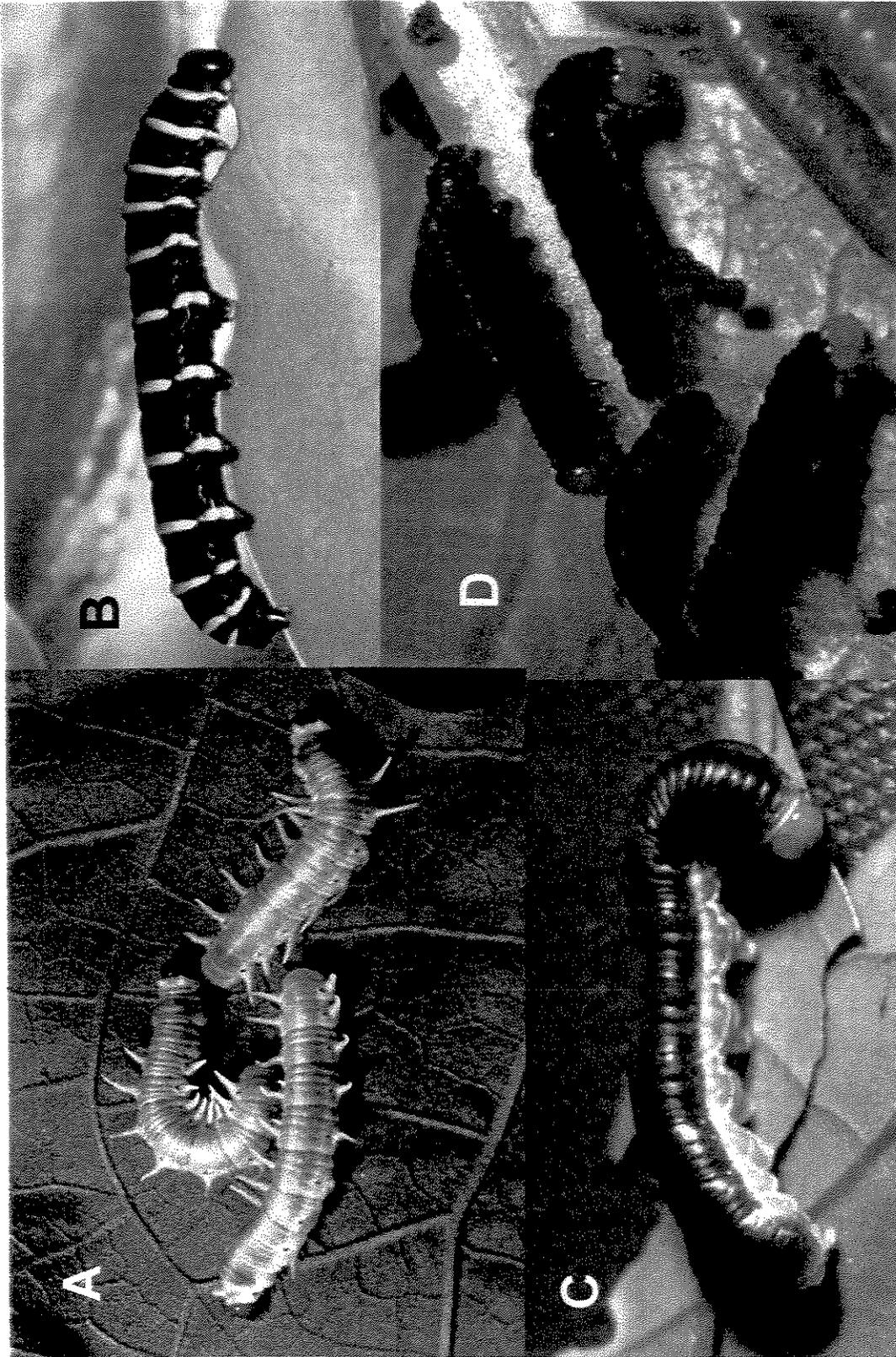


Figura 3.1. Imaturos de 5º estágio de borboletas utilizados nos experimentos. A – *Mechanitis polymnia*; B – *Methona themisto*; C – *Epityches eupompe*; D - *Placidula euryanassa*.

Para os bioensaios, foi utilizada como modelo de predador, a formiga *Camponotus crassus* Mayr (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae), desde que predação por formigas pode ser considerada a maior causa de mortalidade de larvas de borboletas não mirmecófilas em suas plantas hospedeiras (ver Smiley 1985, Jones 1987, Freitas & Oliveira 1996). Esta espécie neotropical é considerada arborícola, utilizando troncos vivos ou mortos e caídos para a construção de seus ninhos (Kusnezov 1951) e é freqüentemente encontrada patrulhando plantas hospedeiras de *Mechanitis polymnia* e outros ithomiíneos e guardando homópteros quando estes estão presentes. Utilizaram-se primeiramente larvas vivas com o objetivo de reproduzir mais acuradamente as condições em que ocorriam os encontros presa (larvas de borboleta) predador (formigas) na natureza, como foi observado para *Mechanitis polymnia* durante o acompanhamento no campo (ver Capítulo I).

3.2.1.1. COLETA E MANUTENÇÃO DE ORGANISMOS

A. CAMPONOTUS CRASSUS

As colônias de *C. crassus* foram coletadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu (22°18'S, 47°10'W), Mogi Guaçu, SP e apresentavam número de operárias semelhante entre si (estimativa visual - o número de indivíduos não foi contado). As colônias foram mantidas em tubos de ensaio (18 x 2,5 cm - comprimento x diâmetro), envolvidos com papel de celofane vermelho, montados em bandejas plásticas quadradas (20 x 20 x 8 cm - comprimento x largura x altura), esta bandeja era conectada a uma outra bandeja circular (15 x 7 cm - diâmetro x altura) usada como arena de forrageamento.

Ambas as bandejas tinham suas paredes laterais internas cobertas com Fluon® para impedir que as formigas escapassem. Um tubo de ensaio com água ficava disponível todo o tempo para cada colônia e alimento era oferecido diariamente (solução aquosa de sacarose 50%, e 1 vez por semana: uma larva de 4° ou 5° estágio da mariposa noctuídea *Spodoptera frugiperda*).

B. IMATUROS DE LEPIDÓPTEROS

Imaturos de *Mechanitis polymnia* utilizados nos testes foram coletados no campus da UNICAMP (22°49'S, 47°05'W), Campinas, SP, na Fazenda Santa Elisa (22°53'S, 47°05'W), Campinas, SP e na Serra do Japi (23°15'S, 46°52'W), Jundiaí, SP; de *Methona themisto* em ambientes urbanos em Campinas, SP; de *Epityches eupompe* e de *Placidula euryanassa* na Serra do Japi, Jundiaí, SP. Após a coleta no campo, os organismos foram criados em folhas de suas respectivas plantas hospedeiras, *Solanum tabacifolium* para *Mechanitis polymnia*, *Brunfelsia uniflora* (Pohl) D. Don para *Methona themisto*, *Aureliana fasciculata* (Vellozo) Sendt. para *Epityches eupompe* e *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Sweet para *Placidula euryanassa* até serem utilizados nos testes. As quatro espécies de plantas hospedeiras acima pertencem à família Solanaceae.

Foram utilizados todos os estádios larvais de *Mechanitis polymnia* e o 1°, 3° e 5° estádios de *Methona themisto*, *Epityches eupompe* e *Placidula euryanassa* em bioensaios em laboratório.

3.2.1.2. BIOENSAIOS COM *CAMPONOTUS CRASSUS*

A colônia de formigas a ser utilizada no teste era alimentada normalmente com solução aquosa de sacarose 50% ou de mel e com uma larva de *Spodoptera frugiperda* 48 horas antes do início do teste para se padronizar o nível de alimentação entre as colônias utilizadas.

Larvas experimentais a serem testadas eram oferecidas às colônias em folhas de suas plantas hospedeiras colocadas em um pequeno vidro com água para que se mantivessem túrgidas durante as 24 horas de duração do experimento. Larvas gregárias (*Mechanitis polymnia* e *Placidula euryanassa*) eram oferecidas em grupos de cinco indivíduos e larvas isoladas (*Methona themisto* e *Epityches eupompe*) uma a uma. Após estas 48 horas (contadas a partir do momento em que se ofereceu a larva de *Spodoptera frugiperda*), era oferecido o organismo ou grupo de organismos (no caso de larvas gregárias) a ser testado. Vinte e quatro horas depois era observado se os organismos haviam sido removidos ou mortos pelas formigas.

Duas categorias de resposta das formigas em relação às larvas foram estipuladas para este teste:

1. **preda:** caso as formigas atacassem o organismo, o matassem e o transportassem para a colônia, para alimentação de seus imaturos; neste caso o teste era considerado encerrado;

2. **não-preda:** caso as formigas não matassem o organismo após as vinte e quatro horas; neste caso era imediatamente oferecida uma larva controle de *Spodoptera frugiperda*, nas mesmas condições dos testes realizados com larvas experimentais, ou seja, colocada em uma folha de uma planta onde *Spodoptera*

frugiperda tem um desenvolvimento comparável a uma de suas plantas hospedeiras (*Ricinus communis* - Euphorbiaceae) (Ferraz 1991). As larvas experimentais não predadas pelas formigas eram criadas até o próximo estágio ou estágio para se certificar de que as formigas não afetaram a sobrevivência; caso as larvas sobrevivessem o teste era considerado encerrado. Nesta resposta, se a larva controle (*Spodoptera frugiperda*) não fosse consumida, o teste era descartado.

A partir dos resultados deste experimento, as espécies foram agrupadas em duas categorias refletindo sua aceitação como presa pelas formigas, para posterior comparação com os resultados de similaridade química (ver item 3.2.2.2):

1. ALTA TAXA DE PREDACÃO: espécies de lepidópteros em que mais de 80% das larvas fossem **predadas**.
2. BAIXA TAXA DE PREDACÃO: espécies de lepidópteros em que mais de 80% das larvas fossem **não-predadas**.

Nas duas últimas respostas, se a larva controle (*Spodoptera frugiperda*) não fosse consumida, o teste era descartado.

A diferença na percentagem de larvas **predadas** entre as espécies de ithomíneos no bioensaio com lepidópteros vivos (experimentos de estádios diferentes agrupados) foi testada através do teste de Kruskal-Wallis (Sokal & Rohlf 1995). Utilizou-se este teste não-paramétrico uma vez que as percentagens de predação não apresentavam distribuição normal mesmo após sua transformação em arcoseno da raiz quadrada da proporção.

3.2.2. LIPÍDIOS CUTICULARES COMO SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS PROMOVEDO DEFESA.

Os resultados obtidos nos experimentos com as larvas vivas indicaram algum mecanismo atuando na cutícula das larvas (ver Resultados: item 3.3.1), visto que a rejeição das larvas se dava apenas através do contato superficial, como também sugerido por Montlor et al. (1991) para outro sistema predador-presa. Uma classe de substâncias potencialmente responsável por defesas deste tipo seriam os lipídios cuticulares. Mais importante foi o fato de as formigas apresentarem um comportamento muito peculiar com as larvas de *Mechanitis polymnia* (ver Resultados: item 3.3.1) indicando que, provavelmente, o tipo de defesa usado por esse lepidóptero seria algum tipo de defesa química que atuava no mecanismo de reconhecimento de presas por *Camponotus crassus*. Lipídios cuticulares teriam algum papel nesta defesa? Formulou-se a hipótese de camuflagem química segundo a qual as espécies que fossem reconhecidas como presa por *Camponotus crassus* teriam o padrão de lipídios cuticulares diferentes de suas plantas hospedeiras, enquanto que *Mechanitis polymnia* teria um padrão bem semelhante ao de suas plantas hospedeiras, não sendo reconhecida como presa.

3.2.2.1. EXTRAÇÃO E ANÁLISES DE LIPÍDIOS CUTICULARES

Todas as larvas de lepidópteros utilizadas na extração dos lipídios cuticulares foram criadas, quando possível, em folhas de um único indivíduo de sua planta hospedeira. Quando as larvas atingiram o início do estágio de pré-pupa elas foram mortas por congelamento em freezer doméstico (-15°C). Realizando-se a extração nesse estágio de desenvolvimento evita-se a

contaminação do extrato por material ingerido, já que seu intestino se encontra vazio. A extração se deu da seguinte maneira (modificado de Haverty et al. 1996 e Young & Schal 1997): cada indivíduo ou grupo de larvas era imerso em 5 ml de hexano para análise de resíduos orgânicos (SupraSolv, Merck, Alemanha) por 5 minutos³. Após este período, era adicionada uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro para retirada da água do extrato e este era filtrado em algodão para retirada do sulfato de sódio. O volume resultante era seco em fluxo suave de nitrogênio e redissolvido em quantidade adequada de hexano para análise (em geral de 100µl a 1ml).

Além da extração das larvas foi feita a extração dos lipídios cuticulares das folhas de suas plantas hospedeiras da mesma forma descrita acima para os lepidópteros, para posterior comparação do padrão químico dos lipídios cuticulares.

Tanto os extratos dos lepidópteros quanto os extratos das folhas foram analisados através de cromatografia gasosa-espectrometria de massas (GC-MS)⁴ por impacto de elétrons em um cromatógrafo a gás Hewlett Packard 6890, equipado com injetor automático Hewlett Packard 7683 e uma coluna de sílica fundida (HP-5MS 5% fenil 95% metil siloxane capilar 30mx250µmx0,25µm nominal, Hewlett Packard) diretamente acoplado a um detector seletivo de massa Hewlett Packard 5973. Condições: temperatura de injeção: 250°C; programa de temperatura: 3 minutos a 70°C, de 70 a 300°C a 10°C/min, 20 minutos a 300°C;

³ Acredita-se que este solvente aliado a este tempo de extração seja suficiente para a extração de praticamente todos os lipídios cuticulares sem que haja extração de lipídios internos do inseto (Young & Schal 1997).

⁴Gas chromatography-mass spectrometry.

gás de arraste He 1ml/min; energia de ionização de 70 eV. Em todas as análises foi utilizada uma amplitude de 40 a 600 uma no espectrômetro de massas.

Em cada grupo de extrações realizadas foi retirada uma amostra de mesmo volume do hexano utilizado e este foi reduzido para aproximadamente 100 μ l passando-se pelo mesmo processo de secagem e filtragem das extrações. Com esta amostra foi feita análise por GC-MS da mesma forma que a descrita acima para os extratos de folhas e de lepidópteros para se detectar quaisquer impurezas presentes no solvente utilizado na obtenção dos extratos.

As substâncias presentes nos extratos foram identificadas através de quatro métodos: (i) pelo padrão de fragmentação de massas; (ii) por comparação com dados de literatura e biblioteca de espectros (NIST98); (iii) por comparação com os tempos de retenção de padrões de alcanos lineares injetados nas mesmas condições acima; (iv) e com o auxílio do cálculo de um índice de retenção das substâncias por regressão exponencial (rampa não isotérmica, tempo de retenção até 26,000 min.) (modificado de van den Dool & Kratz 1963) ou do índice de Kovats (parte isotérmica do programa de temperatura, tempo de retenção de 26,000 a 46,000 min.).

Van den Dool & Kratz (1963) utilizam uma relação linear entre o número de carbonos de n-alcanos e seu tempo de retenção. Entretanto, verificou-se que o melhor ajuste para esse tipo de curva é exponencial (ver Figura 3.2). Desta forma utilizou-se a seguinte fórmula para o cálculo do índice de retenção para substâncias com tempo de retenção até 26,000 min.:

$$IR=[7,5655 \times 2,718^{(0,0527 \times TR)}] \times 100$$

onde: IR= índice de retenção;

TR=tempo de retenção.

Para substâncias com tempo de retenção maior que 26,000 min. utilizou-se a seguinte fórmula do índice de Kovats retirada de Heath & Dueben (1998):

$$IR=(100y)+100(z-y)x[(\log t'_{r(x)} - \log t'_{r(y)})/(\log t'_{r(z)} - \log t'_{r(y)})]$$

onde: IR= índice de Kovats;

x=substância cujo IR está sendo calculado;

y=alcano linear com y carbonos que elui antes de x;

z=alcano linear com z carbonos que elui depois de x;

t'_r=tempo de retenção.

A análise por impacto de elétrons raramente produz o íon molecular de hidrocarbonetos. Então, adicionalmente, algumas amostras mais representativas em termos de diferentes padrões de fragmentação foram analisadas por GC-MS por ionização química positiva com gás metano, utilizando-se o mesmo aparelho e coluna descritos acima, e nas seguintes condições: temperatura de injeção: 250°C; programa de temperatura: 3 minutos a 40°C, de 40 a 70°C a 20°C/min, de 70 à 300°C a 10°C/min, 20 minutos a 300°C; gás de arraste He 1ml/min; ionização química por gás metano a 20psi e fonte de íons a 150°C. Os espectros de massa obtidos por este método sempre mostram o íon molecular das substâncias, facilitando a elucidação estrutural das moléculas quando utilizado conjuntamente

com o padrão de fragmentação por impacto de elétrons. É preciso salientar, entretanto que para hidrocarbonetos saturados de cadeia longa e seus derivados (alcoóis, alcenos, aldeídos), ao contrário de outras classes de substâncias, o pico base do espectro de massas não é $[M+H]^+$, e sim o íon $[M-H]^+$ (Lange et al. 1989 e referências ali citadas).

3.2.2.2. SIMILARIDADE QUÍMICA VERSUS PREDÇÃO POR FORMIGAS

O segundo passo na comprovação da hipótese proposta foi a verificação do grau de similaridade do padrão de hidrocarbonetos cuticulares larva - planta hospedeira e sua correlação com a porcentagem de predação nos experimentos de mortalidade de larvas vivas descritos acima (item 3.2.1.2). Para isto 5 indivíduos de *Mechanitis polymnia*, 8 folhas de *Solanum tabacifolium* (amostra 1), 10 larvas de *Methona themisto*, 16 folhas de *Brunfelsia uniflora*, 3 indivíduos de *Epityches eupompe*, 35 folhas de *Aureliana fasciculata*, 20 larvas de *Placidula euryanassa* e 14 folhas de *Brugmansia suaveolens* foram extraídas e analisadas nas condições acima descritas (Tabela 3.1).

A similaridade do padrão químico dos lipídios cuticulares de cada par larva - planta hospedeira foi estimada através do índice de Morisita, de acordo com a fórmula adaptada retirada de Krebs (1989):

$$C_{\lambda} = (2 \sum^n X_{ij} X_{ik}) / [(\lambda_1 + \lambda_2) N_j N_k]$$

onde: C_{λ} = índice de similaridade de Morisita entre as amostras j e k ;

X_{ij}, X_{ik} = abundância relativa da substância i na amostra j e na amostra k ;

$N_j = \sum X_{ij}$ = abundância relativa total de substâncias na amostra j (sempre 100%);

$N_k = \sum X_{ik}$ = abundância relativa total de substâncias na amostra k (sempre 100%);

$\lambda_1 = \{\sum^n [X_{ij}(X_{ij}-1)]\} / [N_j(N_j-1)]$;

$\lambda_2 = \{\sum^n [X_{ik}(X_{ik}-1)]\} / [N_k(N_k-1)]$.

Wolda (1981) considerou o índice de Morisita o melhor índice de similaridade dentre os 22 índices analisados no seu estudo. O índice de Morisita varia de 1 (total similaridade) a 0 (nenhuma semelhança). Foram consideradas para a análise apenas as substâncias com abundância relativa maior que 1% em cada amostra. Substâncias com abundância relativa menor que 1% têm um efeito desprezível no cálculo do índice.

Para se testar a hipótese de que espécies de borboletas com alto grau de similaridade entre o padrão químico de seus lipídios cuticulares e o padrão químico de suas plantas hospedeiras não seriam reconhecidas como presa por *Camponotus crassus* e vice-versa estava de acordo com os resultados obtidos até o momento, foi feita uma comparação entre os índices de similaridade das

amostras de espécies com ALTA TAXA DE PREDACÃO nos ensaios contra *Camponotus crassus* em laboratório com os índices de similaridade das amostras de espécies com BAIXA TAXA DE PREDACÃO.

A única espécie com baixas taxas de predação nos experimentos com larvas vivas contra *Camponotus crassus* foi *Mechanitis polymnia* (ver Resultados: item 3.3.1). Então para que fosse possível uma comparação estatística entre os índices de similaridade de espécies reconhecidas (ALTA TAXA DE PREDACÃO) e não reconhecidas (BAIXA TAXA DE PREDACÃO) como presa por *Camponotus crassus*, outras amostras de *Mechanitis polymnia* foram tomadas e cada amostra teve seu índice de Morisita calculado. Desta forma, (i) uma amostra de *Mechanitis polymnia* se alimentando de *Solanum paniculatum*; (ii) outra amostra de *Mechanitis polymnia* se alimentando de um indivíduo de *Solanum tabacifolium* (amostra 2) diferente da amostra 1; (iii) *Mechanitis polymnia* se alimentando de *Solanum mauritianum* e (iv) *Mechanitis polymnia* se alimentando de uma espécie não identificada de *Solanum* (sp1) foram extraídas e analisadas, como acima⁵ (item 3.2.2.1) (Tabela 3.1). É conveniente salientar que somente indivíduos da amostra 1 de *Mechanitis polymnia* em *Solanum tabacifolium* foram utilizados nos experimentos realizados. As outras amostras de *Mechanitis polymnia* foram tomadas apenas para permitir análises estatísticas.

⁵ Como não é conhecida a variação nos lipídios cuticulares de lepidópteros e solanáceas, decidiu-se utilizar como unidade amostral cada indivíduo de planta em que as larvas se alimentavam para se definir a separação entre amostras.

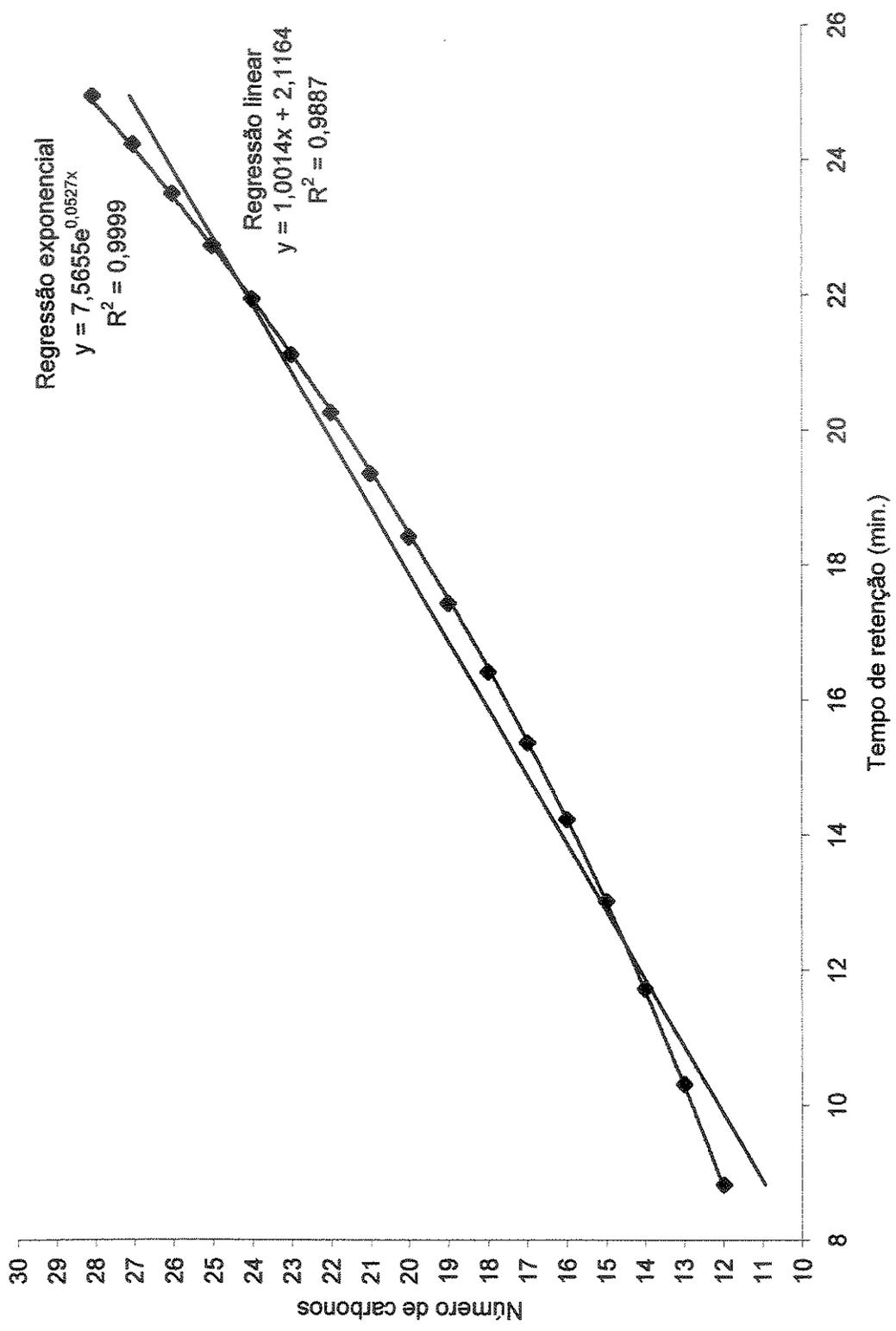


Figura 3.2. Regressão linear e exponencial do número de carbonos de alcanos lineares no tempo de retenção.

Tabela 3.1. Espécies e amostras utilizadas para comparação de índices de similaridade (lepidóptero – planta hospedeira) entre lepidópteros com altas e baixas taxas de predação nos bioensaios com *Camponotus crassus* (para coluna Predação ver Resultados, item 3.3.1). NC = dados não coletados.

Lepidóptero	Planta hospedeira	Predação	Local ou amostra
<i>Mechanitis polymnia</i>	<i>Solanum tabacifolium</i>	BAIXA	UNICAMP – amostra 1
<i>Mechanitis polymnia</i>	<i>Solanum tabacifolium</i>	NC	CPQBA ⁶ – amostra 2
<i>Mechanitis polymnia</i>	<i>Solanum paniculatum</i>	NC	Barão Geraldo, Campinas
<i>Mechanitis polymnia</i>	<i>Solanum mauritianum</i>	NC	Serra do Japi, Jundiá
<i>Mechanitis polymnia</i>	<i>Solanum</i> sp1	NC	Serra do Japi
<i>Methona themisto</i>	<i>Brunfelsia uniflora</i>	ALTA	Barão Geraldo, Campinas
<i>Epityches eupompe</i>	<i>Aureliana fasciculata</i>	ALTA	Serra do Japi, Jundiá
<i>Placidula euryanassa</i>	<i>Brugmansia suaveolens</i>	ALTA	Serra do Japi, Jundiá

⁶ Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas – UNICAMP, Paulínia, SP.

Os índices de similaridade para os pares de espécies lepidóptero – planta hospedeira que tiveram ALTA TAXA DE PREDACÃO (mortalidade > 80%) nos experimentos com *Camponotus crassus* em laboratório foram comparados com os índices de similaridade dos pares de espécies que tiveram BAIXA TAXA DE PREDACÃO (mortalidade < 20%), considerando-se o índice de cada par uma amostra, através de teste *t* de Student após transformação de arcoseno da raiz quadrada da proporção.

3.2.2.3. EXPERIMENTOS DE MUDANÇA DA SIMILARIDADE QUÍMICA ATRAVÉS DE MUDANÇA DA PLANTA HOSPEDEIRA

De acordo com a hipótese proposta de camuflagem química por lipídios cuticulares era esperado que as larvas de *Mechanitis polymnia* que fossem colocadas em situação de baixa similaridade com a folha tivessem uma taxa de predação mais alta do que as larvas colocadas em folhas de sua planta hospedeira, *Solanum tabacifolium* em situação de alta similaridade. Desta forma, uma outra estratégia para se investigar o papel de lipídios cuticulares na defesa contra *Camponotus crassus* foi simular experimentalmente uma diminuição na similaridade do padrão químico entre larvas de *Mechanitis polymnia* e sua planta hospedeira. Para isto larvas de *Mechanitis polymnia* em 5º estágio (pré-pupa) foram liofilizadas⁷ e coladas com cola branca (uma por folha) em folhas de *Brugmansia suaveolens* e oferecidas às formigas. Desta forma foi possível

⁷ Larvas de *Mechanitis polymnia* alimentadas com *Solanum tabacifolium* foram mortas por congelamento e liofilizadas em um liofilizador Labconco modelo Freezone® 6 durante 48 horas. Nas primeiras quatro horas do processo de liofilização o recipiente com as larvas foi mantido mergulhado em um banho de gelo seco e etanol para evitar degradação das larvas, em especial de substâncias em sua cutícula.

verificar o comportamento das formigas em relação às larvas de *Mechanitis polymnia* em uma situação em que as larvas possuíam apenas 14% de similaridade no padrão químico de seus lipídios cuticulares calculada pelo índice de Morisita com a planta em que as larvas foram coladas (ver Resultados, item 3.3.2; Tabela 3.9).

Para comparação com este experimento, larvas de *Mechanitis polymnia*, liofilizadas da mesma forma, foram coladas em folhas da planta em que elas haviam se desenvolvido (*Solanum tabacifolium*) com a qual possuíam 58% de similaridade no padrão químico de seus lipídios cuticulares (ver Resultados, item 3.3.2; Tabela 3.9) ou seja mais que o triplo de similaridade em relação à situação anterior.

Para este experimento utilizou-se folhas de *Brugmansia suaveolens* porque as espécies do gênero *Solanum* apresentam padrão químico de lipídios cuticulares extremamente semelhantes entre si, não sendo útil para o teste da hipótese de camuflagem química. Ainda, se fossem utilizadas larvas vivas de *Mechanitis polymnia*, ao invés de liofilizadas, em folhas de *Brugmansia suaveolens* elas provavelmente deixariam as folhas, uma vez que são especialistas no gênero *Solanum*, inviabilizando o experimento.

Cada folha com a larva liofilizada colada era então colocada em um vidro com água e este era colocado na arena de forrageamento da colônia de formigas da mesma forma descrita no experimento com larvas vivas (item 3.2.1.2). Depois de 24 horas as larvas eram cuidadosamente inspecionadas para verificar danos causados pelas formigas. Larvas liofilizadas apresentam cutícula mais dura do que larvas vivas, causando uma maior dificuldade para remoção de partes da

larva pelas formigas. Mesmo assim, as formigas eram capazes de remover grandes partes das larvas no período de 24 horas. Se após as 24 horas as larvas de *Mechanitis polymnia* liofilizadas estivessem intactas, sem qualquer dano visível, larvas controle palatáveis de *Spodoptera frugiperda* também liofilizadas eram oferecidas por 24 horas às formigas em folhas da mesma espécie em que o experimento havia acontecido (*Brugmansia suaveolens* ou *Solanum tabacifolium*). O experimento somente era considerado válido se, após as 24 horas, a larva de *Spodoptera frugiperda* apresentasse danos visíveis causados pelas formigas.

A proporção de indivíduos predados entre os experimentos de *Mechanitis polymnia* em *Solanum tabacifolium* (alta similaridade) e em *Brugmansia suaveolens* (baixa similaridade) foi comparada através do teste de χ^2 para homogeneidade de amostras binomiais (Snedecor & Cochran 1989).

3.2.2.4. EXPERIMENTOS DE MUDANÇA DO PADRÃO QUÍMICO DE LIPÍDIOS CUTICULARES

A hipótese de camuflagem através da semelhança química entre imaturos de lepidópteros e suas plantas hospedeiras implica que as formigas não reconheçam como presa qualquer organismo que apresente uma composição química da cutícula semelhante ao de sua planta hospedeira. Desta forma, se mudarmos o padrão químico de uma larva que as formigas reconhecem como presa (p.e. *Spodoptera frugiperda*) para o padrão químico de uma planta, é esperado que as formigas passem a não reconhecer esta larva como presa quando esta estiver sobre folhas desta planta. Por outro lado se colocarmos esta mesma larva sobre uma planta com padrão químico diferente, as formigas deverão reconhecê-la como presa.

Larvas de *Spodoptera frugiperda* foram criadas em laboratório em dieta artificial (Ferraz 1991) para serem utilizadas como modelos palatáveis a serem oferecidos para as formigas, tendo seu padrão de lipídios cuticulares mudado para se testar a hipótese de camuflagem química. Larvas de *S. frugiperda* no final do 5° ou início do 6° estágio de desenvolvimento foram mortas por congelamento em freezer (-15°C). Estas larvas tiveram seus lipídios cuticulares extraídos através de imersão em hexano como acima (item 3.2.2.1) utilizando-se o dobro do tempo de extração (10 minutos ao invés de cinco). Young & Schal (1997) demonstraram que este tempo de extração é suficiente para a retirada de virtualmente todos os lipídios cuticulares. Após a extração, as larvas foram liofilizadas, mantendo-se palatáveis para as formigas e facilitando a aplicação dos extratos. Desta forma, obtivemos modelos de lepidópteros palatáveis e normalmente predados pelas formigas sem qualquer lipídio em sua cutícula para a realização dos bioensaios descritos abaixo.

Três grupos de experimentos de dupla escolha foram realizados com os modelos de lepidópteros palatáveis:

- (a) ALTA SIMILARIDADE - uma das larvas simulava uma condição de alta similaridade química com sua planta hospedeira e na outra era aplicado somente o solvente;
- (b) BAIXA SIMILARIDADE - uma das larvas simulava uma condição de baixa similaridade com sua planta hospedeira e na outra era aplicado somente o solvente;
- (c) CONTROLE - o terceiro era o controle onde em uma das larvas era aplicado somente o solvente e na outra nada era aplicado.

ALTA SIMILARIDADE: nos modelos de lepidópteros palatáveis foram aplicados topicamente os extratos dos lipídios cuticulares das folhas de *Solanum tabacifolium* - planta hospedeira de *Mechanitis polymnia* numa quantidade equivalente aos lipídios presentes em 10 larvas de *Mechanitis polymnia* corrigida pelo peso seco das larvas de *Spodoptera frugiperda* (aproximadamente 60mg) em relação ao peso seco das larvas de *Mechanitis polymnia* (aproximadamente 30mg). Para isto foi realizada quantificação dos lipídios presentes em larvas de *Mechanitis polymnia* através de coinjeção de amostras dos extratos desta espécie com um padrão conhecido em cromatografia gasosa-detector de ionização de chamas (GC-FID⁸) em um cromatógrafo gasoso Hewlett Packard 5890, série II, equipado com uma coluna de sílica fundida (SA-5 30m x 0,25mm, Sigma-Aldrich) nas mesmas condições acima. Utilizou-se como padrão externo para quantificação o estearato de metila. Tomando-se como base as principais substâncias (quantitativamente responsáveis por aproximadamente 80-90% de todas as substâncias no extrato) presentes nos extratos larvais, foi calculada a quantidade de lipídios presentes em uma larva. Esta quantidade foi utilizada para o cálculo da quantidade de extrato necessária para aplicação nas larvas modelo de *Spodoptera frugiperda*.

Em experimentos preliminares verificou-se que uma quantidade de extrato nas larvas modelo igual a 1 vez à quantidade presente em *Mechanitis polymnia* não foi suficiente para tornar as larvas de *Spodoptera frugiperda* não reconhecidas como presa. Isto ocorreu, provavelmente, porque apenas parte das substâncias aplicadas às larvas se mantém disponíveis na cutícula para interações entre as

⁸ Gas chromatography-flame ionization detector

larvas e as formigas. Além disso, nem todas as partes da larva modelo devem receber a mesma quantidade de lipídios durante a aplicação do extrato, mesmo tomando-se precauções para que isto não aconteça. Portanto, utilizou-se uma quantidade de extrato nas larvas modelo 10 vezes maior do que a presente nas larvas de *Mechanitis polymnia*.

Com os modelos de *Spodoptera frugiperda* foram realizados 7 bioensaios, oferecendo-se duas larvas em uma folha de *Solanum tabacifolium*: uma larva controle, onde foram espalhados uniformemente 50µl de hexano SupraSolv Merck e outra experimental onde foram espalhada 120µg do extrato lipídico cuticular de *Solanum tabacifolium* dissolvidos em 50µl de hexano. Após a aplicação das substâncias, os modelos foram deixados à temperatura ambiente por 15 minutos para que ocorresse a evaporação do solvente, e então foram colados à folha de *Solanum tabacifolium* com cola branca (Figura 3.3). Após isto, a folha com os modelos era oferecida à uma colônia de formigas, da mesma forma descrita para os experimentos de mortalidade de larvas (item 3.2.1.2). Uma vez no ninho, foi calculado um Índice de Visitação em 30 minutos de observação, da seguinte forma: ao final de cada minuto a partir do primeiro encontro de qualquer das duas larvas, contou-se o número de formigas em contato com cada uma das duas larvas. Ao final de cada experimento obtiveram-se 30 contagens do número de formigas em cada larva, calculando, assim, o Índice de Visitação Experimental (IVE):

$$\text{IVE} = (nV_e/nV_e+nV_c).100$$

onde, IVE: Índice de Visitação Experimental;

nV_e : número de visitas na larva experimental;

nV_c : número de visitas na larva controle.

Assim, os Índices de Visitação (IVs) próximos de 50 indicam um número igual de visitas nas larvas controle e experimental, os significativamente maiores que 50 indicam maior recrutamento para a larva experimental e os menores que 50 indicam um maior recrutamento para a larva controle.

BAIXA SIMILARIDADE: para se demonstrar que a falta de um padrão químico semelhante ao da folha em que uma larva de lepidóptero está pode ser responsável por sua predação por formigas, foi realizado um bioensaio com os mesmos procedimentos descritos acima, com exceção da folha em que eram colocadas as larvas de *Spodoptera frugiperda*. Foram realizados seis experimentos em que uma das duas larvas modelo recebia aplicação do solvente e a outra recebia aplicação do extrato de *Solanum tabacifolium* da mesma forma e quantidade descritos acima (120 µg/ larva). As larvas então eram colocadas em uma folha de *Brugmansia suaveolens* e o experimento era conduzido da mesma forma descrita acima (Figura 3.3). *Brugmansia suaveolens* foi escolhida porque a similaridade do padrão químico de lipídios cuticulares de suas folhas com o padrão de *Solanum tabacifolium* é de apenas 39% conforme calculado previamente através do índice de Morisita (ver Resultados, item 3.3.2; Tabela 3.9).

CONTROLE: para que ambos os experimentos de mudança do padrão químico de lipídios cuticulares pudessem ser comparados estatisticamente ao caso onde as duas larvas modelo fossem reconhecidas igualmente como presa, seis bioensaios controle foram realizados da seguinte forma: duas larvas modelo de *Spodoptera frugiperda* eram coladas a uma folha de *Solanum tabacifolium* sendo que em uma larva era aplicado 50 μ l do hexano utilizado nas extrações e na outra larva não era aplicado nada. As larvas eram oferecidas às colônias de *Camponotus crassus* da mesma forma que nos outros experimentos e um Índice de Visitação Controle (IVC) era calculado de mesma forma descrita no bioensaio de simulação de camuflagem química.

O IVE dos experimentos de simulação de camuflagem química e de não camuflagem foram comparados ao IVC, e entre si, com auxílio do teste de Kruskal-Wallis (Sokal & Rohlf 1995). Este teste não-paramétrico foi utilizado uma vez que os dados não apresentavam distribuição normal.

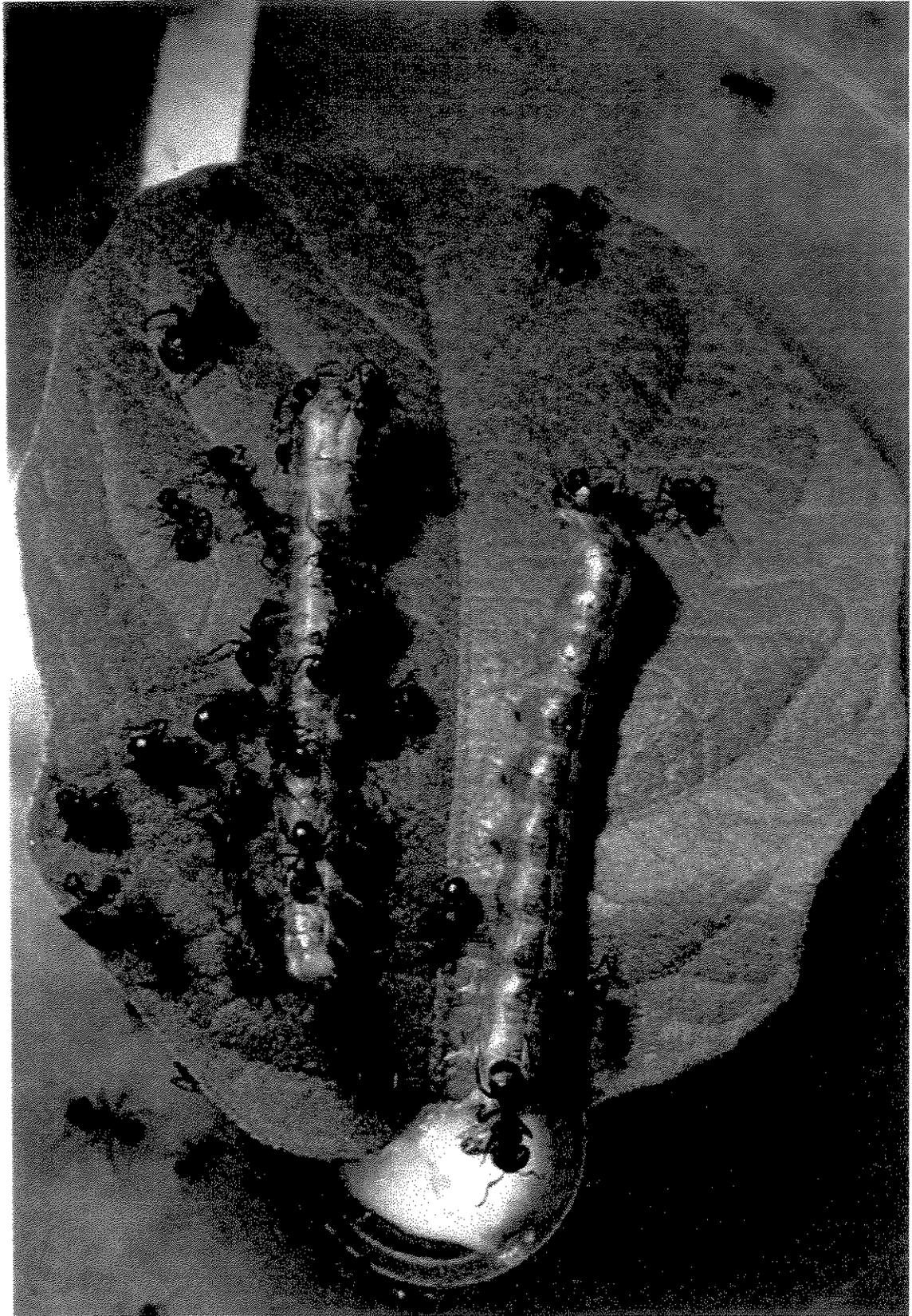


Figura 3.3. Experimentos de mudança do padrão químico de lipídios cuticulares com larvas liofilizadas de *Spodoptera frugiperda*.

3.2.3. SIMILARIDADE QUÍMICA ENTRE BORBOLETAS ITHOMIINAE E SUAS PLANTAS HOSPEDEIRAS

Os lipídios cuticulares das larvas de algumas espécies na subfamília Ithomiinae e suas respectivas plantas hospedeiras foram analisados (ver item 3.2.2.1), com o objetivo de se identificar outras espécies de borboletas que potencialmente utilizariam o mesmo tipo de mecanismo de defesa anti-predação (camuflagem química) que foi observado para *Mechanitis polymnia*. As espécies para esta análise foram escolhidas de acordo com sua disponibilidade no campo durante o estudo, tentando-se abranger o maior número de gêneros possíveis dentro desta subfamília de borboletas. Este estudo se limitou aos ithomiíneos e a duas espécies filogeneticamente próximas, do gênero *Danaus* (Brown & Freitas 1994), para que fosse possível uma análise mais extensa de espécies filogeneticamente mais próximas a *Mechanitis polymnia* (Tabela 3.2). Utilizou-se novamente o índice de Morisita para estimar a similaridade química entre larvas e suas respectivas plantas hospedeiras e identificar espécies que possivelmente utilizariam a camuflagem química como mecanismo de defesa. Para o cálculo deste índice foram utilizados os dados de abundância relativa das substâncias presentes nos extratos analisados por GC-MS. Somente substâncias com abundância relativa maior que 1% foram considerados na análise.

Tabela 3.2. Relação de lepidópteros e plantas hospedeiras analisados quanto a lipídios cuticulares, similaridade química entre o padrão de lipídios cuticulares das larvas e das folhas de suas plantas hospedeiras.

Lepidóptero	Planta hospedeira	Local
<i>Danaus plexippus</i>	<i>Asclepias curassavica</i>	Serra do Japi, Jundiaí
<i>Danaus gilippus</i>	<i>Asclepias curassavica</i>	Serra do Japi, Jundiaí
<i>Dircenna dero</i>	<i>Solanum megalochiton</i>	Serra do Japi, Jundiaí
<i>Episcada clausina</i>	<i>Solanum</i> sp2	Serra do Japi, Jundiaí
<i>Epityches eupompe</i>	<i>Aureliana fasciculata</i>	Serra do Japi, Jundiaí
<i>Hypothyris euclea</i>	<i>Solanum mauritianum</i>	Serra do Japi, Jundiaí
<i>Ithomia drymo</i>	<i>Aureliana fasciculata</i>	Serra do Japi, Jundiaí
<i>Mechanitis polymnia-</i> amostra 1	<i>Solanum tabacifolium</i>	UNICAMP, Campinas
<i>Mechanitis lysimnia</i>	<i>Solanum</i> sp3	Serra do Japi, Jundiaí
<i>Methona themisto</i>	<i>Brunfelsia uniflora</i>	Barão Geraldo, Campinas
<i>Oleria</i> sp	<i>Aureliana fasciculata</i>	Serra do Japi, Jundiaí
<i>Placidula euryanassa</i>	<i>Brugmansia suaveolens</i>	Serra do Japi, Jundiaí
<i>Prittwitzia</i> sp	<i>Solanum</i> sp2	Serra do Japi, Jundiaí
<i>Pseudoscada erruca</i>	<i>Solanum</i> sp2	Serra do Japi, Jundiaí
<i>Pteronymia carlia</i>	<i>Solanum</i> sp2	Serra do Japi, Jundiaí

3.3. RESULTADOS

3.3.1. BIOENSAIOS COM LEPIDÓPTEROS VIVOS

Em todos os casos em que as larvas foram mortas, as formigas levaram o corpo, ao menos parcialmente, para o ninho. Entretanto, algumas vezes com larvas de 5º estágio de *Methona themisto* e *Placidula euryanassa* nem todo o corpo foi removido ao fim do experimento.

Durante a realização dos experimentos de mortalidade frente a *Camponotus crassus* foi observado que as larvas de *Mechanitis polymnia* se comportavam de forma diferente em relação às outras espécies. As larvas de *Mechanitis polymnia* não exibiam nenhum comportamento defensivo contra as formigas quando estas estavam em contato, nem mesmo quando as formigas se encontravam sobre as larvas. *Methona themisto* por outro lado apresentou comportamento defensivo, movendo vigorosamente a parte anterior do corpo quando alguma formiga antenava a larva, afastando a formiga. Esta pode ser uma diferença importante quando consideramos a eficiência do grau de similaridade química da cutícula como uma forma de defesa anti-predação contra *Camponotus crassus*.

Com relação ao comportamento das formigas frente às larvas também se observaram comportamentos diferenciados de acordo com a espécie em questão. O comportamento frente às larvas de *Mechanitis polymnia* era diferente do comportamento em relação às larvas de *Methona themisto*, *Epityches eupompe* e *Placidula euryanassa*. Quando as formigas encontravam larvas de *Mechanitis polymnia* não demonstravam nenhum tipo de comportamento agressivo que pudesse indicar o reconhecimento das larvas desta espécie como presa. Em

casos extremos, mas não raros, as formigas chegaram a andar sobre as larvas da mesma forma como andavam sobre a folha. Com as outras espécies testadas (*Methona themisto*, *Epityches eupompe* e *Placidula euryanassa*) as formigas apresentavam comportamentos agressivos que indicavam um reconhecimento das larvas como presa, em alguns casos atacando as larvas ao primeiro encontro.

Foi observada uma grande homogeneidade na sobrevivência das larvas de *Mechanitis polymnia*, *Methona themisto*, *Epityches eupompe* e *Placidula euryanassa* (Tabela 3.3). *Mechanitis polymnia* foi sistematicamente não morta por *Camponotus crassus*, enquanto que *Methona themisto*, *Epityches eupompe* e *Placidula euryanassa* foram quase sempre mortas pelas formigas.

Tabela 3.3. Mediana da percentagem de sobrevivência de larvas de *Mechanitis polymnia*, *Methona themisto*, *Epityches eupompe* e *Placidula euryanassa* em ensaios com *Camponotus crassus* em laboratório. As colunas n indicam o número de experimentos realizados (n amostral). As colunas med indicam a mediana da percentagem de sobrevivência. NC indica dados não coletados.

Lepidóptero	primeiro		segundo		terceiro		quarto		quinto		total	
	n	med	n	med	n	med	n	med	n	med	n	med
<i>Mechanitis polymnia</i>	9	100%	4	100%	4	100%	3	100%	5	100%	25	100%
<i>Methona themisto</i>	1	0%	NC	NC	4	0%	NC	NC	6	0%	11	0%
<i>Epityches eupompe</i>	2	0%	NC	NC	3	0%	NC	NC	6	0%	11	0%
<i>Placidula euryanassa</i>	3	0%	NC	NC	1	0%	NC	NC	3	0%	7	0%

3.3.2. SIMILARIDADE QUÍMICA VERSUS PREDACÃO POR FORMIGAS.

Durante a análise de espectrometria de massas dos cromatogramas obtidos por impacto de elétrons observou-se principalmente a presença de alcanos lineares (Figura 3.4), alcanos ramificados, que foram caracterizados de acordo com Nelson & Sukkestad (1970) (Figura 3.5) e uma terceira classe de substâncias (Figura 3.6A, B), a princípio não identificadas, mas se supõe que sejam compostos oxigenados de cadeia longa (provavelmente cetonas) de acordo com seu espectro de massas por ionização química (Figura 3.6B) e por impacto de elétrons (Figura 3.6A). Investigações mais profundas, utilizando técnicas de derivatização (Attygalle 1998) serão necessárias para a correta identificação das classes e caracterização das substâncias presentes nos extratos.

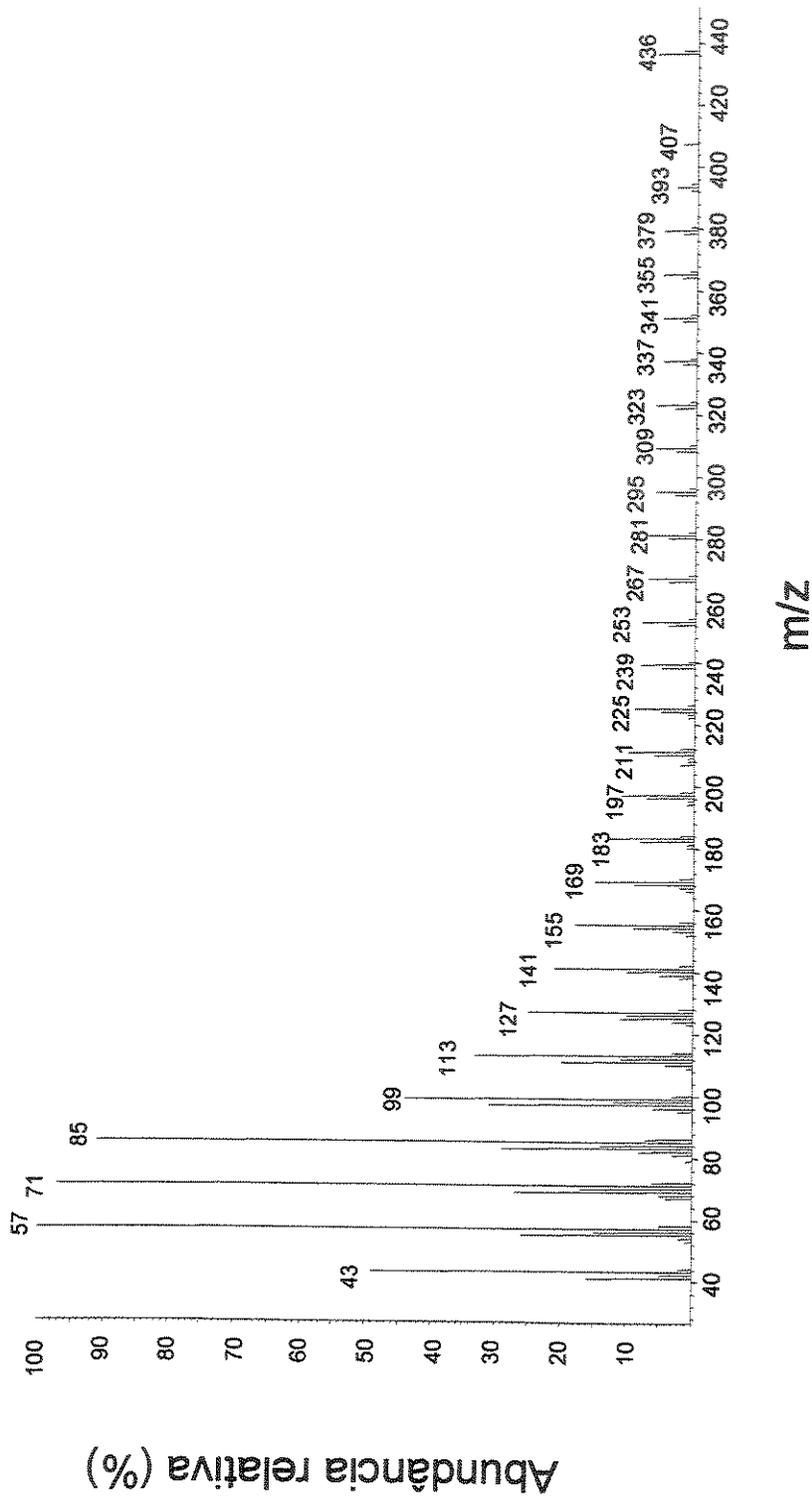


Figura 3.4. Espectro de massas de hentriacontano (PM 436).

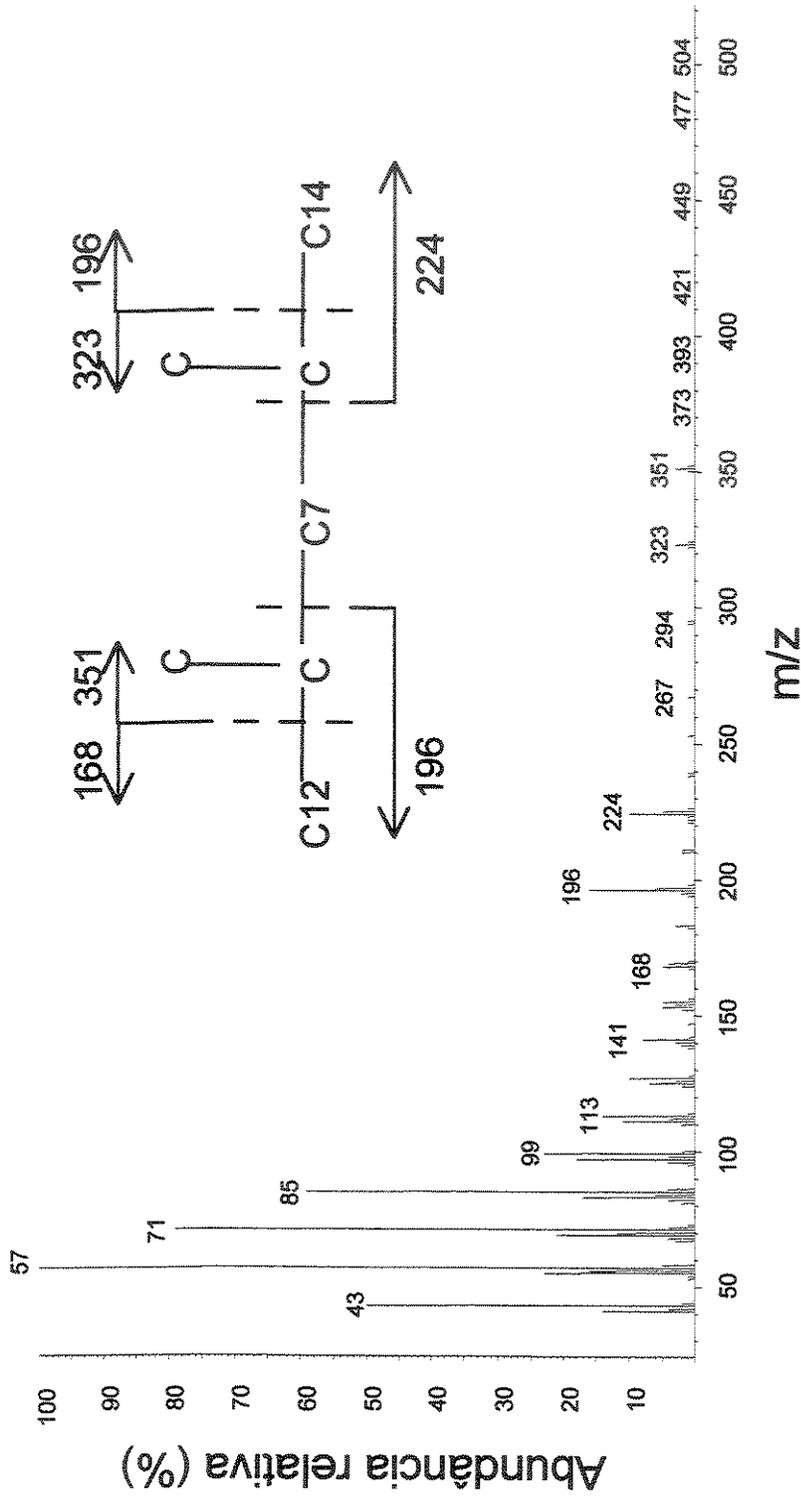
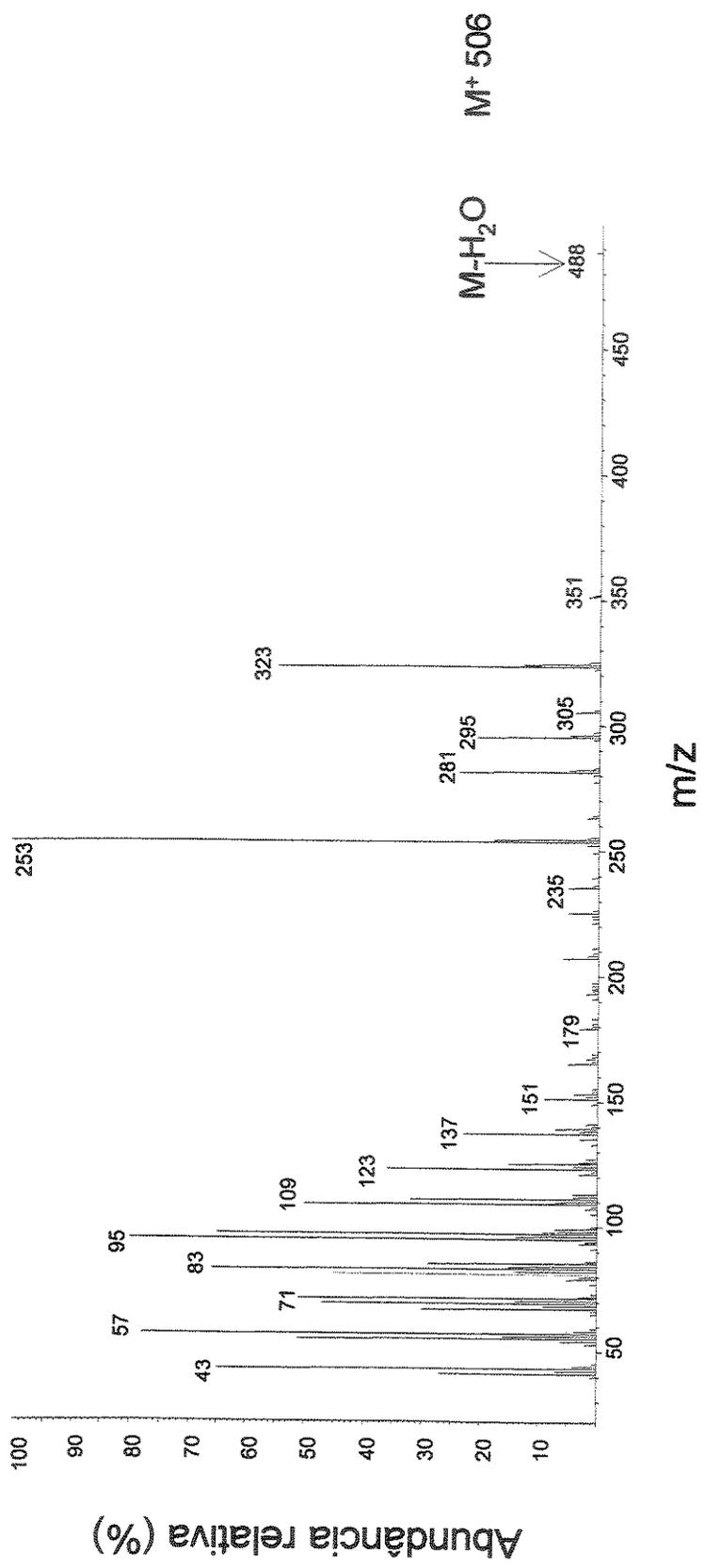


Figura 3.5. Espectro de massas de 13, 21 - dimetilpentatriacontano (PM 520). Sugestão para estrutura da substância correspondente ao pico número 17 de larvas de *Mechanitis polymnia* alimentada com *Solanum paniculatum* (Figura 3.11A, Tabela 3.8).

A. Impacto de elétrons.



B. Ionização química.

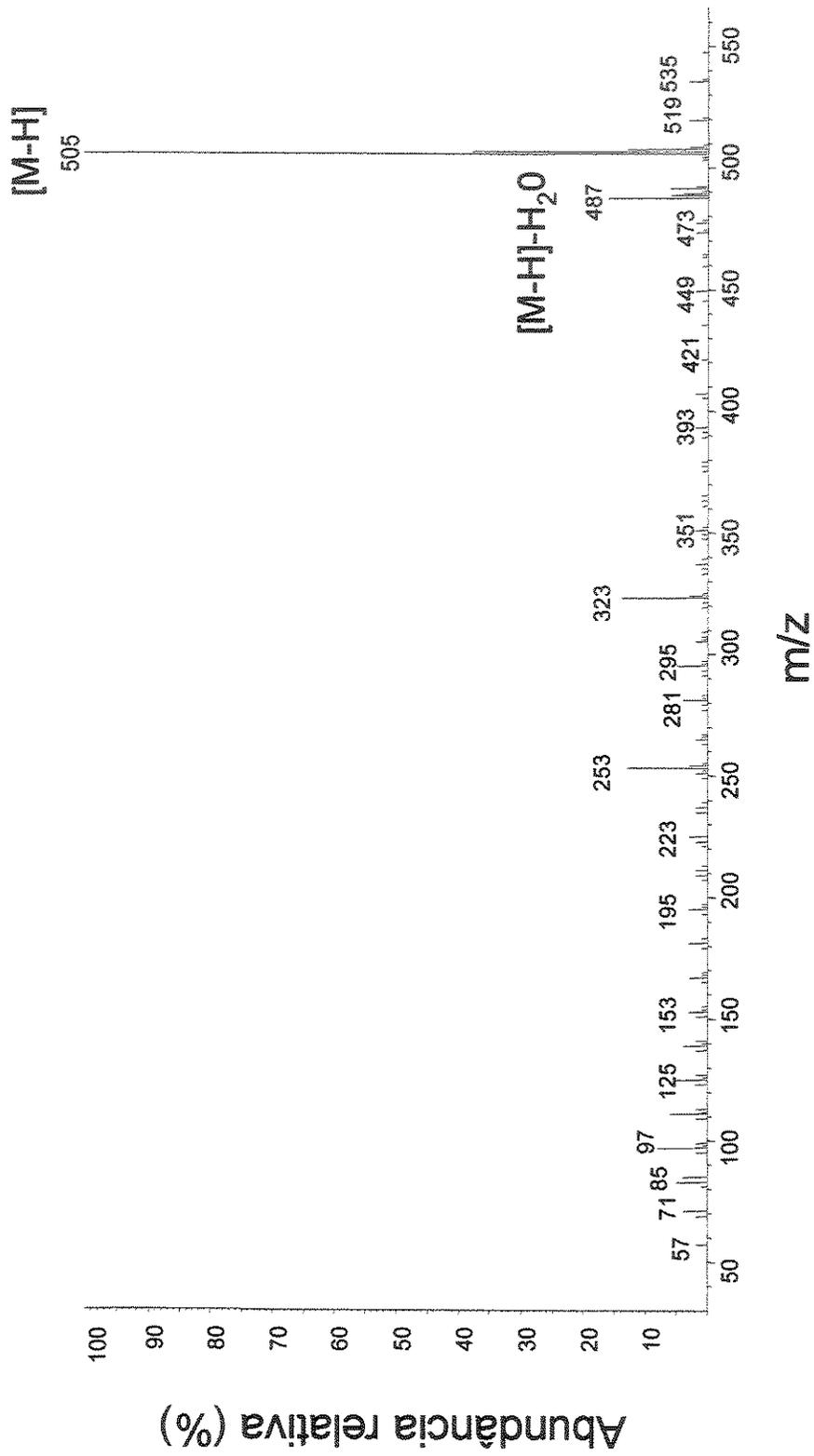


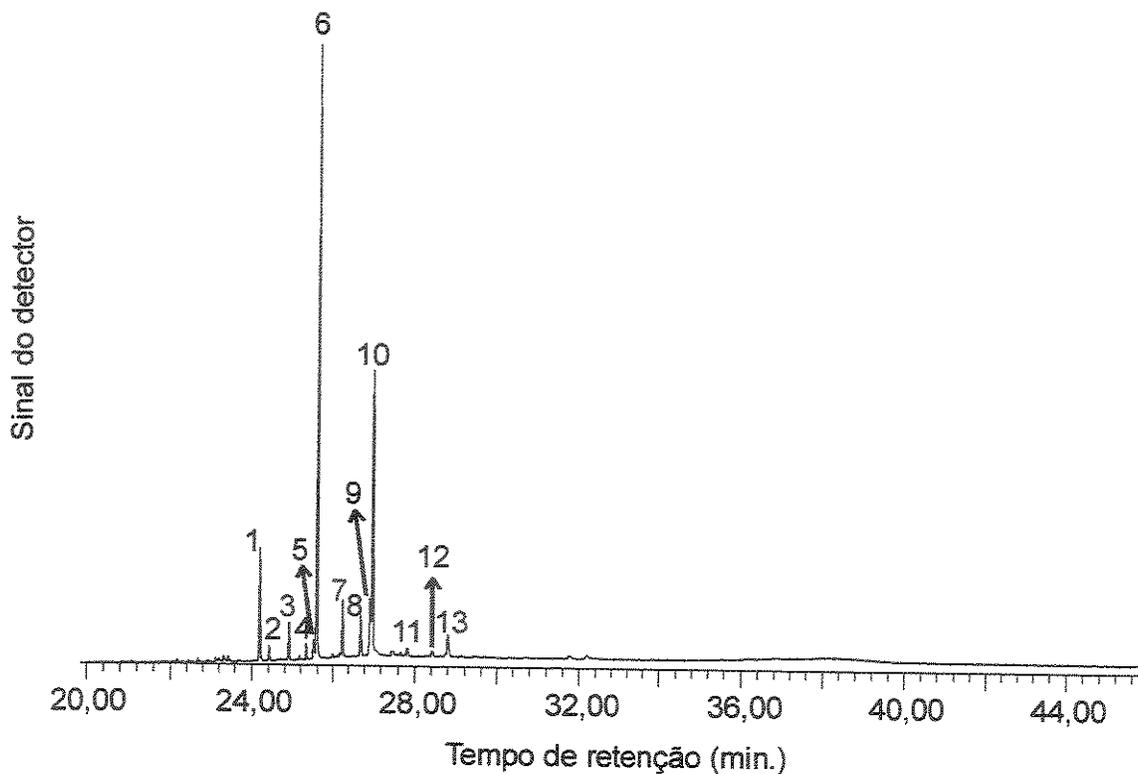
Figura 3.6. Espectro de massas por impacto de elétrons (A) e ionização química por metano (B) da substância correspondente ao pico número 22 de *Placidula euryanassa* (Figura 3.10A, Tabela 3.7).

Na maioria das amostras de *Mechanitis polymnia* a análise dos cromatogramas dos extratos lipídicos das cutículas demonstrou que o padrão químico de hidrocarbonetos cuticulares apresenta os mais altos graus de similaridade com o padrão de suas plantas hospedeiras, *Solanum tabacifolium* (Figura 3.7A e B, Tabela 3.4), *Solanum paniculatum* (Figura 3.11A e B, Tabela 3.8) em relação aos outros lepidópteros em questão e suas plantas hospedeiras (Tabela 3.9) respectivamente: *Methona themisto* (Figura 3.8A) e *Brunfelsia uniflora* (Figura 3.8B, Tabela 3.5), *Epityches eupompe* (Figura 3.9A) e *Aureliana fasciculata* (Figura 3.9B, Tabela 3.6) e *Placidula euryanassa* (Figura 3.10A) e *Brugmansia suaveolens* (Figura 3.10B, Tabela 3.7).

Somente a amostra de *Mechanitis polymnia* se alimentando de *Solanum tabacifolium* – amostra 1 - foi testada quanto à predação por *Camponotus crassus* (ver item 3.2.1). Para permitir uma comparação estatística entre o índice de similaridade de *Mechanitis polymnia* e os índices das outras espécies, os índices das outras amostras de *Mechanitis polymnia* (*Mechanitis polymnia* e *Solanum tabacifolium* - amostra 2; *Mechanitis polymnia* e *Solanum paniculatum*; *Mechanitis polymnia* e *Solanum mauritianum*; *Mechanitis polymnia* e *Solanum* sp1) foram utilizados. Os índices de similaridade entre *Methona themisto* e *Brunfelsia uniflora*, entre *Epityches eupompe* e *Aureliana fasciculata* e entre *Placidula euryanassa* e *Brugmansia suaveolens* (altas taxas de predação) foram comparados com os índices de similaridade entre as cinco amostras diferentes de *Mechanitis polymnia* e suas plantas hospedeiras (baixas taxas de predação). Em concordância com a hipótese proposta, os índices de similaridade de Morisita dos lepidópteros com altas taxas de predação (n=3) foram significativamente menores

do que os índices de *Mechanitis polymnia* (n=5) (teste *t* de Student, $p < 0,05$), que foi a única espécie nos experimentos que apresentou baixas taxas de predação. As espécies com altas taxas de predação apresentaram um índice de Morisita médio (± 1 desvio padrão) de $0,04 \pm 0,05$; *Mechanitis polymnia* teve um índice de Morisita médio (± 1 desvio padrão) de $0,58 \pm 0,09$ (Figura 3.12). Pode-se observar que o índice de Morisita médio de *Mechanitis polymnia* foi 14,5 vezes maior do que o das espécies com altas taxas de predação pelas formigas.

A. Larvas de *Mechanitis polymnia*.



B. Folhas de *Solanum tabacifolium*.

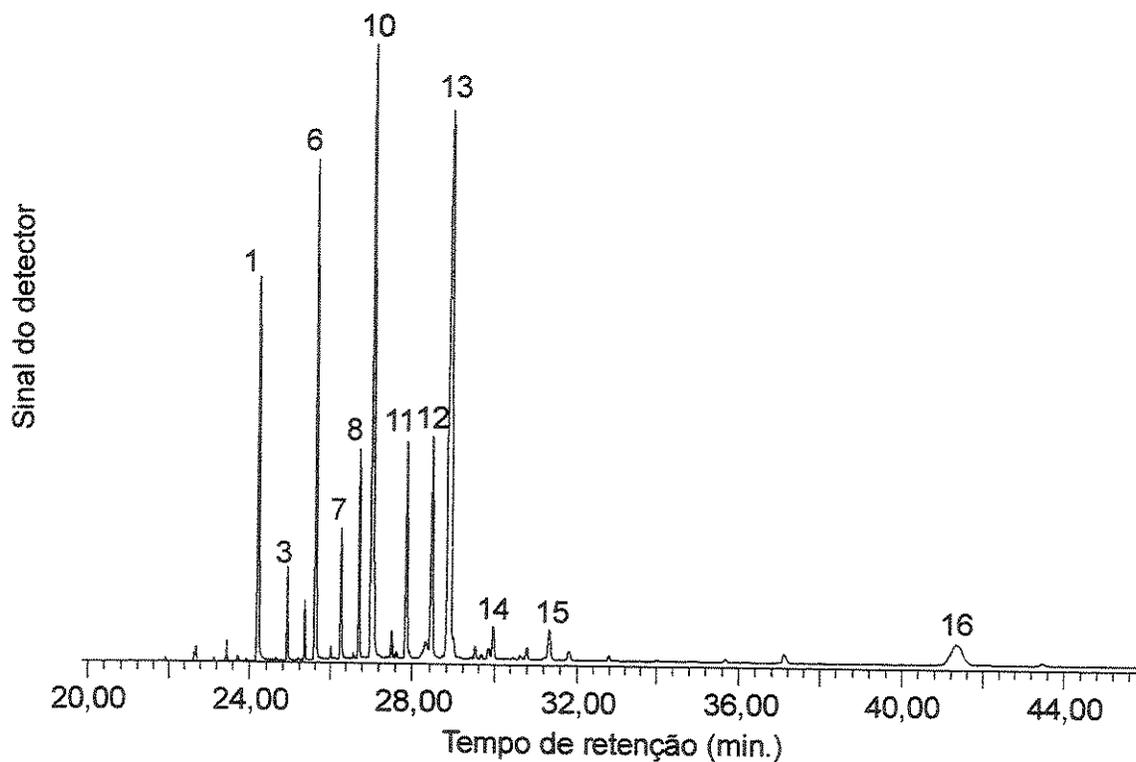
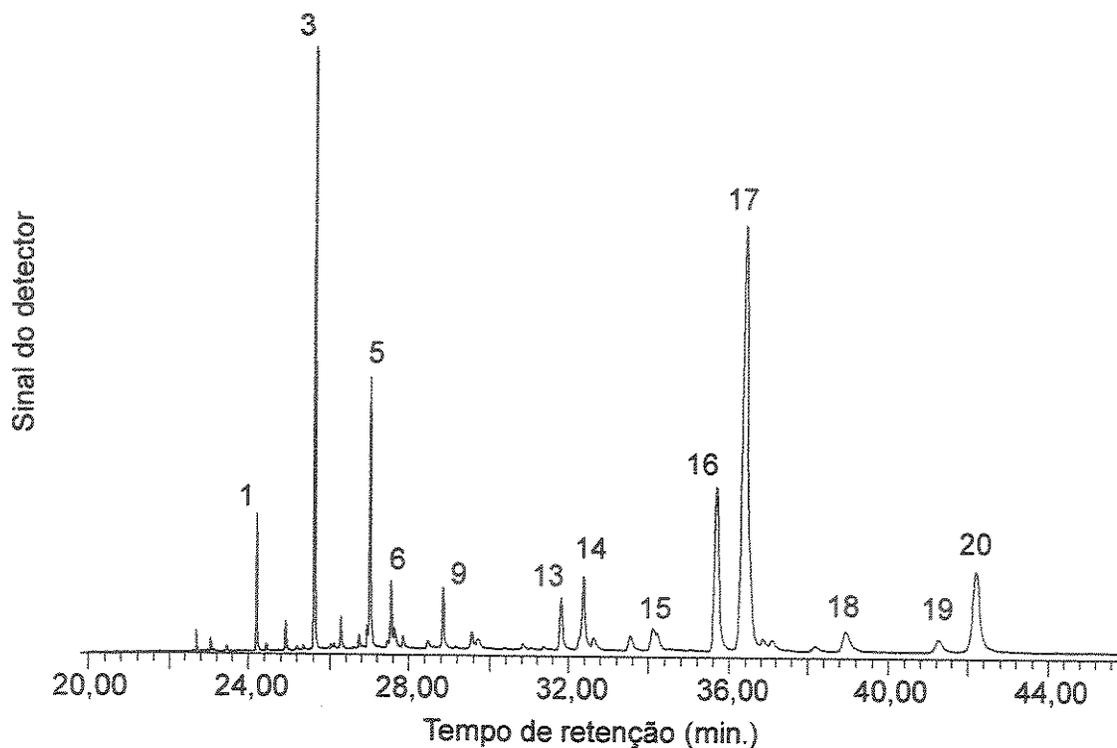


Figura 3.7. Cromatogramas dos extratos hexânicos cuticulares de larvas de *Mechanitis polymnia* e folhas de *Solanum tabacifolium* – amostra 1. Os números se referem às substâncias da Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Substâncias encontradas nos extratos hexânicos da cutícula de larvas de *Mechanitis polymnia* e de folhas de *Solanum tabacifolium* – amostra 1 através da análise por GC-MS. A coluna NS indica os números das substâncias na Figura 3.7. A coluna PM indica o peso molecular das substâncias. A coluna IR indica o índice de retenção das substâncias. As colunas TRMP1 e MP1 são, respectivamente, o tempo de retenção e a abundância relativa (%) das substâncias presentes em *Mechanitis polymnia*. As colunas TRST1 e ST1 são, respectivamente, o tempo de retenção e a abundância relativa (%) das substâncias presentes em *Solanum tabacifolium*. Ver Apêndice I para substâncias desconhecidas.

NS	Substância	PM	IR	TRMP1	MP1	TRST1	ST1
1	heptacosano	380	2700	24,182	6,781	24,210	8,553
2	hidrocarboneto ramificado		2739	24,418	1,051		0
3	octacosano	394	2800	24,894	2,387	24,916	1,369
4	hidrocarboneto ramificado		2875	25,333	1,014		0
5	desconhecida		2903	25,517	1,702		0
6	nonacosano	408	2900	25,599	44,525	25,628	10,112
7	triacontano	422	3000	26,254	4,368	26,282	2,188
8	hidrocarboneto ramificado		3054	26,705	2,971	26,740	3,494
9	desconhecida		3082	26,929	5,215		0
10	hentriacontano	436	3100	26,993	23,669	27,070	21,447
11	dotriacontano	450	3200	27,824	1,013	27,871	5,076
12	hidrocarboneto ramificado		3250		0	28,475	6,747
13	tritriacontano	464	3300	28,802	2,968	28,926	25,980
14	tetratriacontano		3400		0	29,994	1,031
15	pentatriacontano	492	3500		0	31,367	1,240
16	hidrocarboneto ramificado		3914		0	41,332	4,390

A. Larvas de *Methona themisto*.



B. Folhas de *Brunfelsia uniflora*.

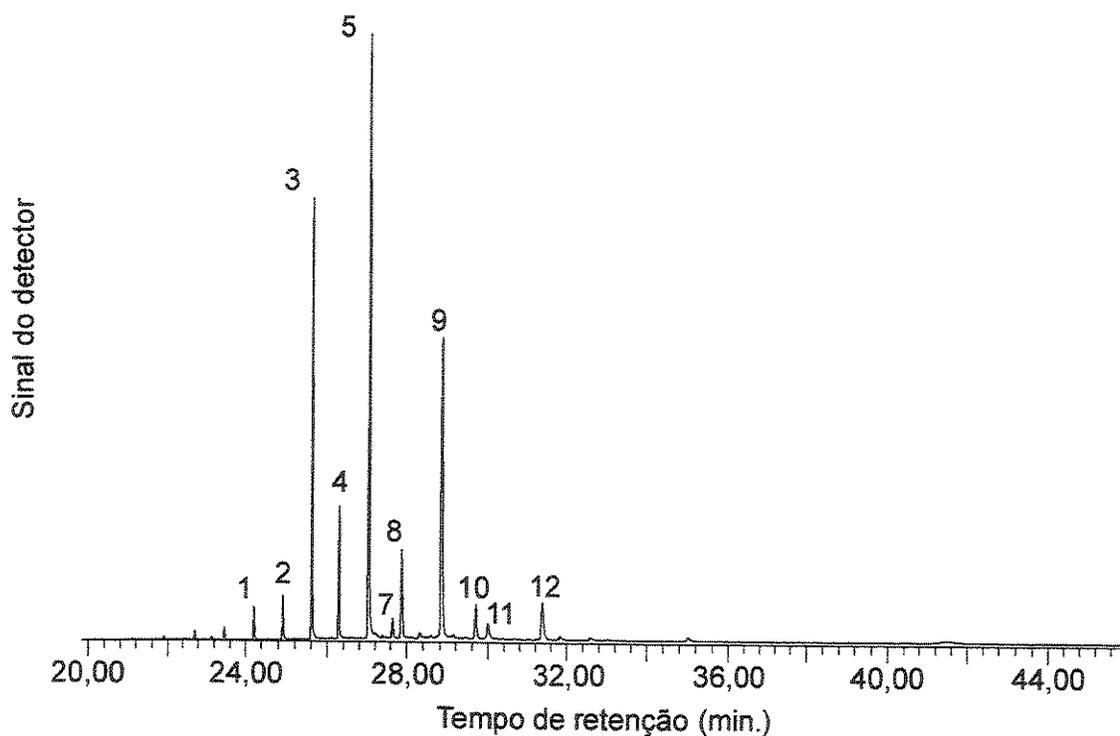
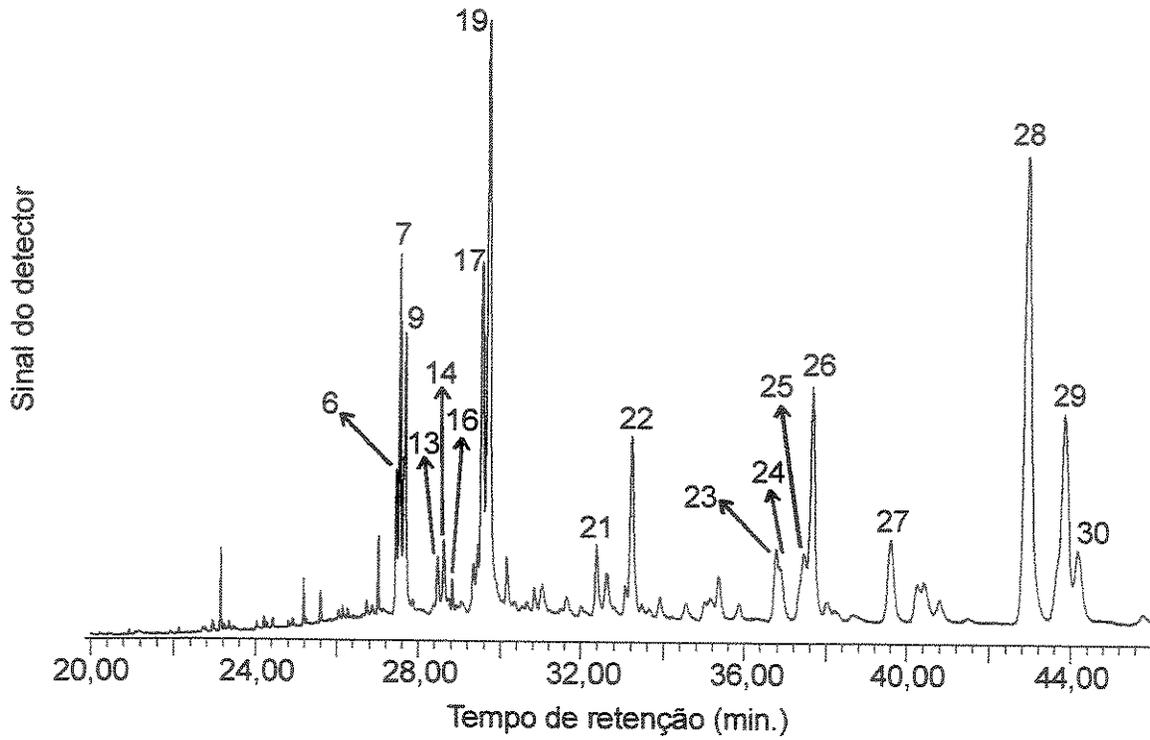


Figura 3.8. Cromatogramas dos extratos hexânicos cuticulares de larvas de *Methona themisto* e folhas de *Brunfelsia uniflora*. Os números se referem às substâncias da Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Substâncias encontradas nos extratos hexânicos da cutícula de larvas de *Methona themisto* e de folhas de *Brunfelsia uniflora* através da análise por GC-MS. A coluna NS indica os números das substâncias na Figura 3.8. A coluna PM indica o peso molecular das substâncias. A coluna IR indica o índice de retenção das substâncias. As colunas TRMT e MT são, respectivamente, o tempo de retenção e a abundância relativa (%) das substâncias presentes em *Methona themisto*. As colunas TRBU e BU são, respectivamente, o tempo de retenção e a abundância relativa (%) das substâncias presentes em *Brunfelsia uniflora*. Ver Apêndice II para substâncias desconhecidas.

NS	Substância	PM	IR	TRMT	MT	TRBU	BU
1	heptacosano	380	2700	24,21	1,948	24,214	1,296
2	octacosano	394	2800	24,922	0	24,926	1,819
3	nonacosano	408	2900	25,621	9,66	25,618	18,179
4	triacontano	422	3000	26,289	0	26,286	5,638
5	hentriacontano	436	3100	27,026	5,356	27,048	36,66
6	desconhecida	450	3162	27,56	1,59		0
7	hidrocarboneto ramificado		3172		0	27,646	1,131
8	dotriacontano	450	3200		0	27,868	5,172
9	tritriacontano	464	3300	28,85	1,776	28,86	20,899
10	hidrocarboneto ramificado		3349		0	29,692	2,685
11	hidrocarboneto ramificado		3373		0	29,997	1,359
12	pentatriacontano	492	3500		0	31,376	3,913
13	hidrocarboneto ramificado		3510	31,811	2,27		0
14	desconhecida		3552	32,38	3,55		0
15	hidrocarboneto ramificado	534	3644	34,112	1,232		0
16	hidrocarboneto ramificado	534	3707	35,676	11,141		0
17	hidrocarboneto ramificado	548	3736	36,413	39,486		0
18	hidrocarboneto ramificado	562	3830	38,949	2,252		0
19	hidrocarboneto ramificado	562	3911	41,256	1,38		0
20	hidrocarboneto ramificado	576	3943	42,203	8,856		0

A. Larvas de *Epityches eupompe*.



B. Folhas de *Aureliana fasciculata*.

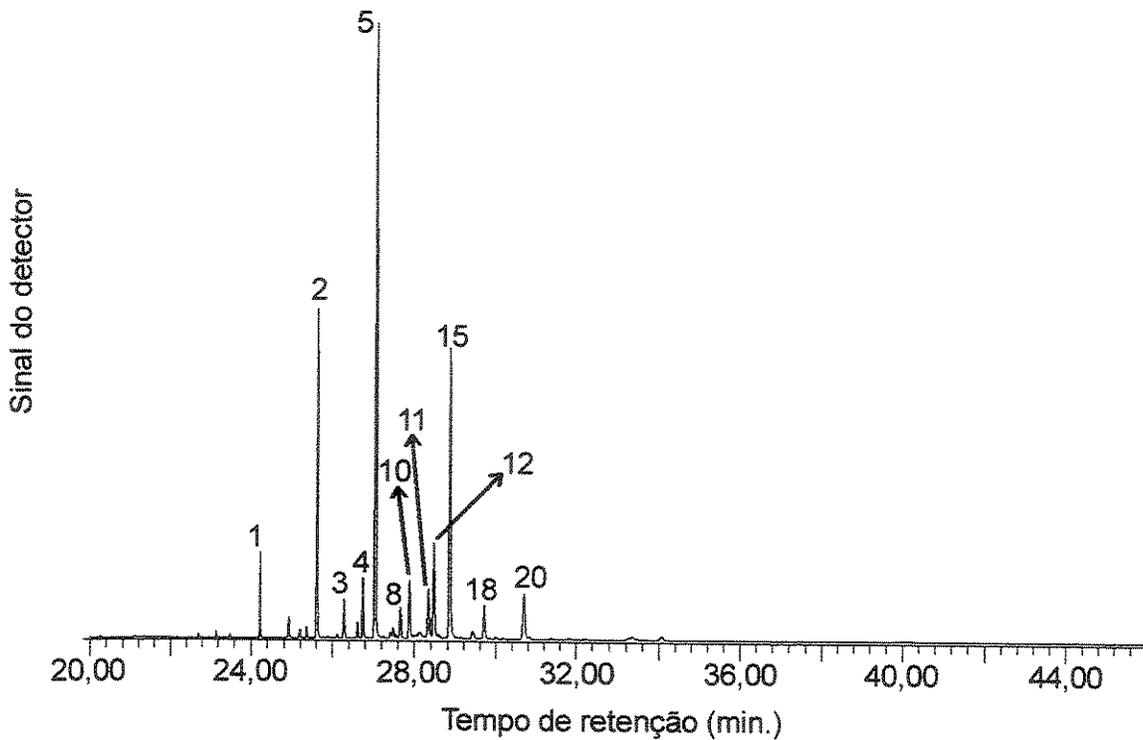


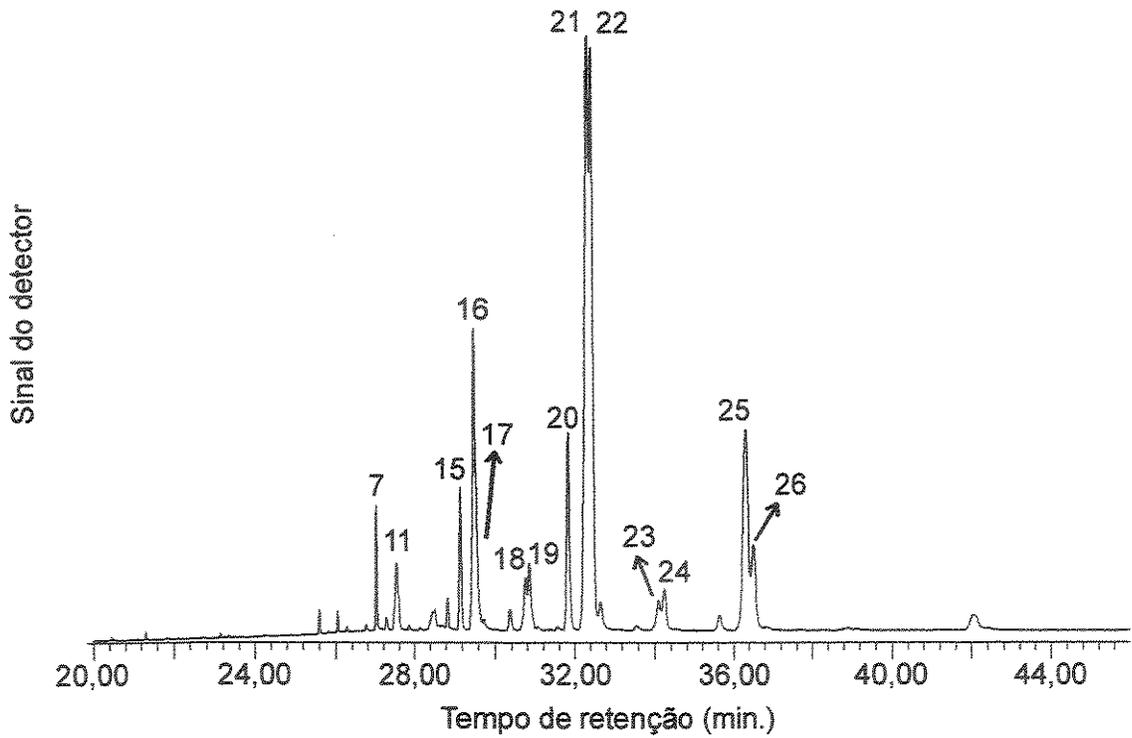
Figura 3.9. Cromatogramas dos extratos hexânicos cuticulares de larvas de *Epityches eupompe* e folhas de *Aureliana fasciculata*. Os números se referem às substâncias da Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Substâncias encontradas nos extratos hexânicos da cutícula de larvas de *Epityches eupompe* e de folhas de *Aureliana fasciculata* através da análise por GC-MS. A coluna NS indica os números das substâncias na Figura 3.9. A coluna PM indica o peso molecular das substâncias. A coluna IR indica o índice de retenção das substâncias. As colunas TREE e EE são, respectivamente, o tempo de retenção e a abundância relativa (%) das substâncias presentes em *Epityches eupompe*. As colunas TRAL, AL e IRAL são, respectivamente, o tempo de retenção, a abundância relativa (%) e o índice de retenção das substâncias presentes em *Aureliana fasciculata*. Ver Apêndice III para substâncias desconhecidas.

NS	Substância	PM	IR	TREE	EE	TRAL	AL
1	heptacosano	380	2700		0	24,217	3,506
2	nonacosano	408	2900		0	25,623	13,04
3	triacontano	422	3000		0	26,289	2,082
4	hidrocarboneto ramificado		3059		0	26,749	3,036
5	hentriacontano	436	3100		0	27,045	34,442
6	desconhecida		3149	27,461	1,531		0
7	desconhecida	450	3160	27,55	4,131		0
8	hidrocarboneto ramificado		3173		0	27,654	1,828
9	desconhecida	450	3176	27,677	4,773		0
10	dotriacontano	450	3200		0	27,876	3,411
11	desconhecida		3239		0	28,336	2,845
12	hidrocarboneto ramificado		3250		0	28,473	5,955
13	desconhecida	464	3251	28,477	1,01		0
14	desconhecida	464	3264	28,636	1,337		0
15	tritriacontano	464	3300		0	28,87	19,794
16	desconhecida		3329	29,45	1,086		0
17	desconhecida		3338	29,564	6,747		0
18	hidrocarboneto ramificado		3350		0	29,705	2,763
19	desconhecida		3350	29,710	16,023		0
20	desconhecida		3426		0	30,694	3,881
21	desconhecida		3552	32,38	1,412		0
22	desconhecida		3607	33,225	4,479		0
23	hidrocarboneto ramificado		3750	36,780	2,041		0
24	desconhecida		3754	36,89	1,458		0

NS	Substância	PM	IR	TREE	EE	TRAL	AL
25	desconhecida		3775	37,451	2,68		0
26	desconhecida		3784	37,667	7,259		0
27	desconhecida		3854	39,606	3,404		0
28	desconhecida		3968	42,949	22,016		0
29	desconhecida		3997	43,864	11,488		0
30	desconhecida		4007	44,182	3,516		0

A. Larvas de *Placidula euryanassa*.



B. Folhas de *Brugmansia suaveolens*.

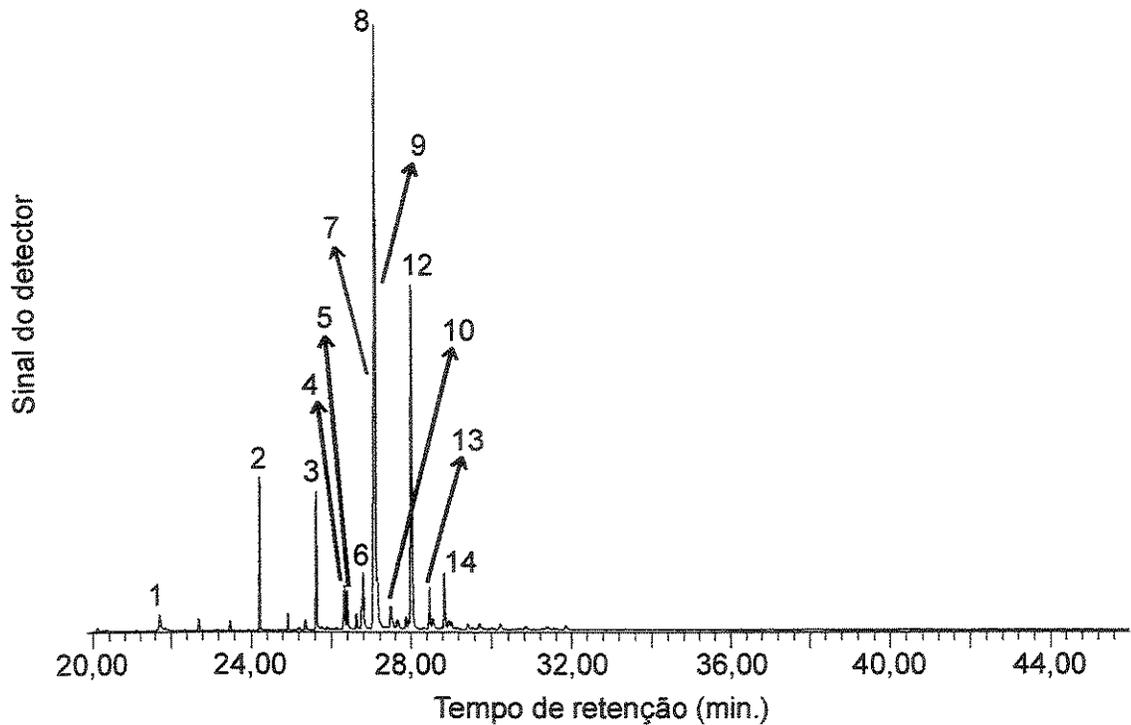


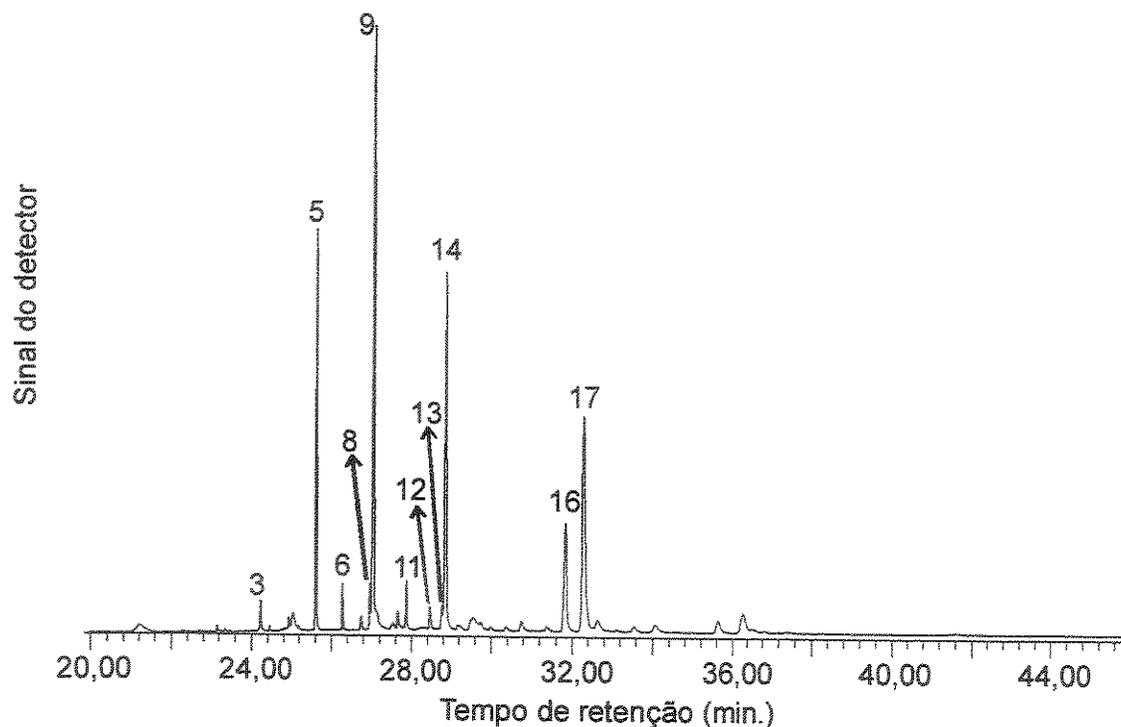
Figura 3.10. Cromatogramas dos extratos hexânicos cuticulares de larvas de *Placidula euryanassa* e folhas de *Brugmansia suaveolens*. Os números se referem às substâncias da Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Substâncias encontradas nos extratos hexânicos da cutícula de larvas de *Placidula euryanassa* e de folhas de *Brugmansia suaveolens* através da análise por GC-MS. A coluna NS indica os números das substâncias na Figura 3.10. A coluna PM indica o peso molecular das substâncias. A coluna IR indica o índice de retenção das substâncias. As colunas TRPE e PE são, respectivamente, o tempo de retenção e a abundância relativa (%) das substâncias presentes em *Placidula euryanassa*. As colunas TRBS e BS são, respectivamente, o tempo de retenção e a abundância relativa (%) das substâncias presentes em *Brugmansia suaveolens*. Ver Apêndice IV para substâncias desconhecidas.

NS	Substância	PM	IR	TRPE	PE	TRBS	BS
1	desconhecida		2370		0	21,710	1,263
2	heptacosano	380	2700		0	24,222	5,504
3	nonacosano	408	2900	25,609	0	25,629	6,190
4	desconhecida		3004		0	26,321	2,256
5	desconhecida		3013		0	26,390	1,759
6	desconhecida		3065		0	26,797	2,877
7	hentriacontano	436	3100	27,020	1,674	27,068	14,591
8	desconhecida		3104		0	27,104	26,881
9	desconhecida		3110		0	27,151	3,150
10	Vitamina E	430	3153		0	27,490	1,964
11	hidrocarboneto ramificado	464	3159	27,537	1,902		0
12	desconhecida		3213		0	28,024	20,196
13	hidrocarboneto ramificado		3250		0	28,473	2,543
14	trtriacontano	464	3300		0	28,854	3,298
15	hidrocarboneto ramificado	478	3306	29,162	3,183		0
16	hidrocarboneto ramificado	492	3333	29,499	6,795		0
17	desconhecida	478	3340	29,581	5,215		0
18	hidrocarboneto ramificado	506	3431	30,757	1,790		0
19	desconhecida	492	3438	30,846	2,145		0
20	hidrocarboneto ramificado	506	3512	31,831	7,060		0
21	hidrocarboneto ramificado	520	3550	32,352	29,848		0
22	desconhecida	506	3557	32,448	18,348		0
23	hidrocarboneto ramificado	534	3644	34,094	1,356		0
24	desconhecida	520	3650	34,246	1,836		0
25	hidrocarboneto ramificado	548	3733	36,324	12,296		0

NS Substância	PM	IR	TRPE	PE	TRBS	BS
26 desconhecida	534	3739	36,502	4,152		0

A. Larvas de *Mechanitis polymnia*.



B. Folhas de *Solanum paniculatum*.

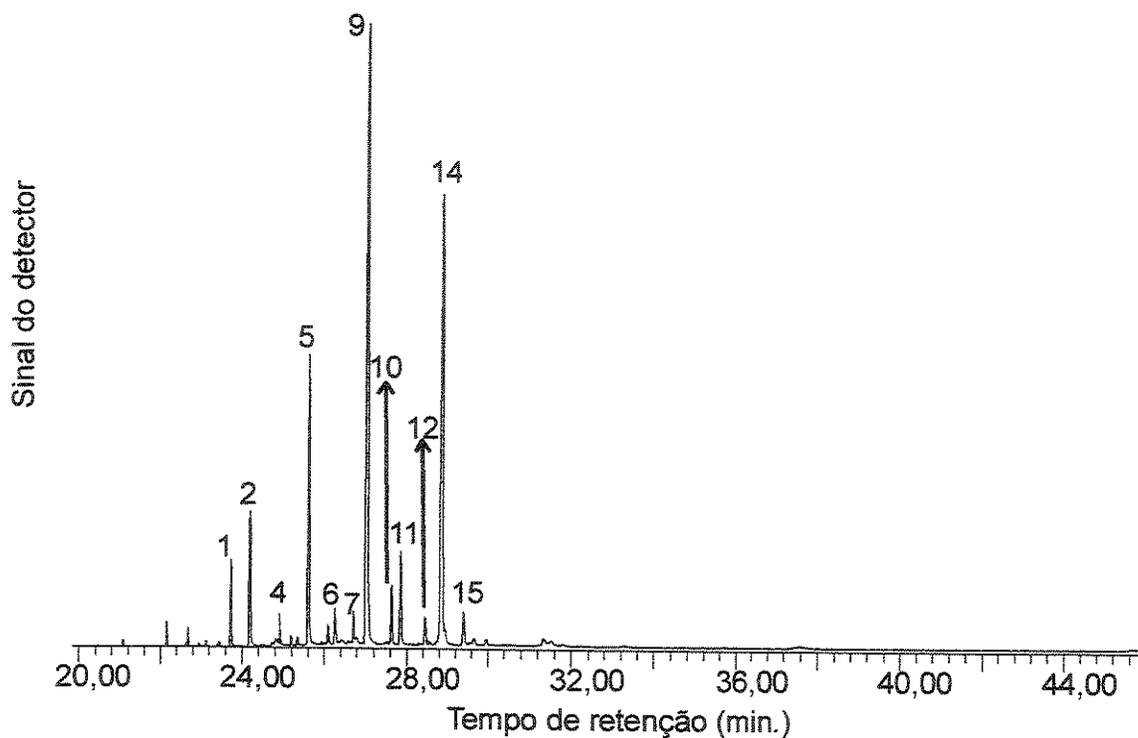


Figura 3.11. Cromatogramas dos extratos hexânicos cuticulares de larvas de *Mechanitis polymnia* alimentadas com *Solanum paniculatum* e folhas de *Solanum paniculatum*. Os números se referem às substâncias da Tabela 3.8.

Tabela 3.8. Substâncias encontradas nos extratos hexânicos da cutícula de larvas de *Mechanitis polymnia* alimentadas com *Solanum paniculatum* e de folhas de *S. paniculatum* através da análise por GC-MS. A coluna NS indica os números das substâncias na Figura 3.11. A coluna PM indica o peso molecular das substâncias. A coluna IR indica o índice de retenção das substâncias. As colunas TRMP e MP são, respectivamente, o tempo de retenção e a abundância relativa (%) das substâncias presentes em *Mechanitis polymnia*. As colunas TRSP e SP são, respectivamente, o tempo de retenção e a abundância relativa (%) das substâncias presentes em *Solanum paniculatum*. Ver Apêndice V para substâncias desconhecidas.

NS	Substância	PM	IR	TRMP	MP	TRSP	SP
1	desconhecida		2637		0	23,734	2,474
2	desconhecida		2699		0	24,192	5,578
3	heptacosano	380	2700	24,213	1,117		0
4	desconhecida		2805		0	24,91	1,045
5	nonacosano	408	2900	25,618	12,749	25,609	10,518
6	triacontano	422	3000	26,285	1,641	26,276	1,505
7	hidrocarboneto ramificado		3056		0	26,727	1,026
8	desconhecida		3086	26,959	1,862		0
9	hentriacontano	436	3100	27,035	27,232	27,045	35,117
10	hidrocarboneto ramificado		3170		0	27,63	2,423
11	dotriacontano	450	3200	27,867	2,229	27,852	4,1
12	hidrocarboneto ramificado		3249	28,465	1,118	28,443	1,281
13	desconhecida		3274	28,764	1,22		0
14	tritriacontano	464	3300	28,859	19,72	28,863	30,052
15	gamma sitosterol		3326		0	29,403	1,632
16	hidrocarboneto ramificado	506	3511	31,821	9,697		0
17	hidrocarboneto ramificado	520	3545	32,285	21,414		0

Tabela 3.9. Índices de similaridade para cada par larva – planta hospedeira obtidos a partir das substâncias encontradas nas análises por GC-MS. Morisita – índice de Morisita (varia de 0 – nenhuma similaridade a 1 total similaridade); MP1-ST1 - *Mechanitis polymnia* e *Solanum tabacifolium* - amostra 1; MP2-ST2 – *Mechanitis polymnia* e *Solanum tabacifolium* - amostra 2; MP-SP – *Mechanitis polymnia* e *Solanum paniculatum*; MP-SM - *Mechanitis polymnia* e *Solanum mauritianum*; MP-Ssp1 - *Mechanitis polymnia* e *Solanum sp1*; MT-BU - *Methona themisto* e *Brunfelsia uniflora*; EE-AL - *Epityches eupompe* e *Aureliana fasciculata*; PE-BS - *Placidula euryanassa* e *Brugmansia suaveolens*. MP-BS e ST-BS indicam os índices de similaridade calculados para realização dos experimentos de mudança de planta hospedeira e não camuflagem química, respectivamente (itens 2.4.2.1 e 2.4.2.2.1)

Lepidóptero-planta	Morisita
MP1-ST1	0,59
MP2-ST2	0,85
MP-SP	0,84
MP-SM	0,41
MP-Ssp1	0,19
MT-BU	0,21
EE-AL	0
PE-BS	0,02
MP-BS	0,14
ST-BS	0,39

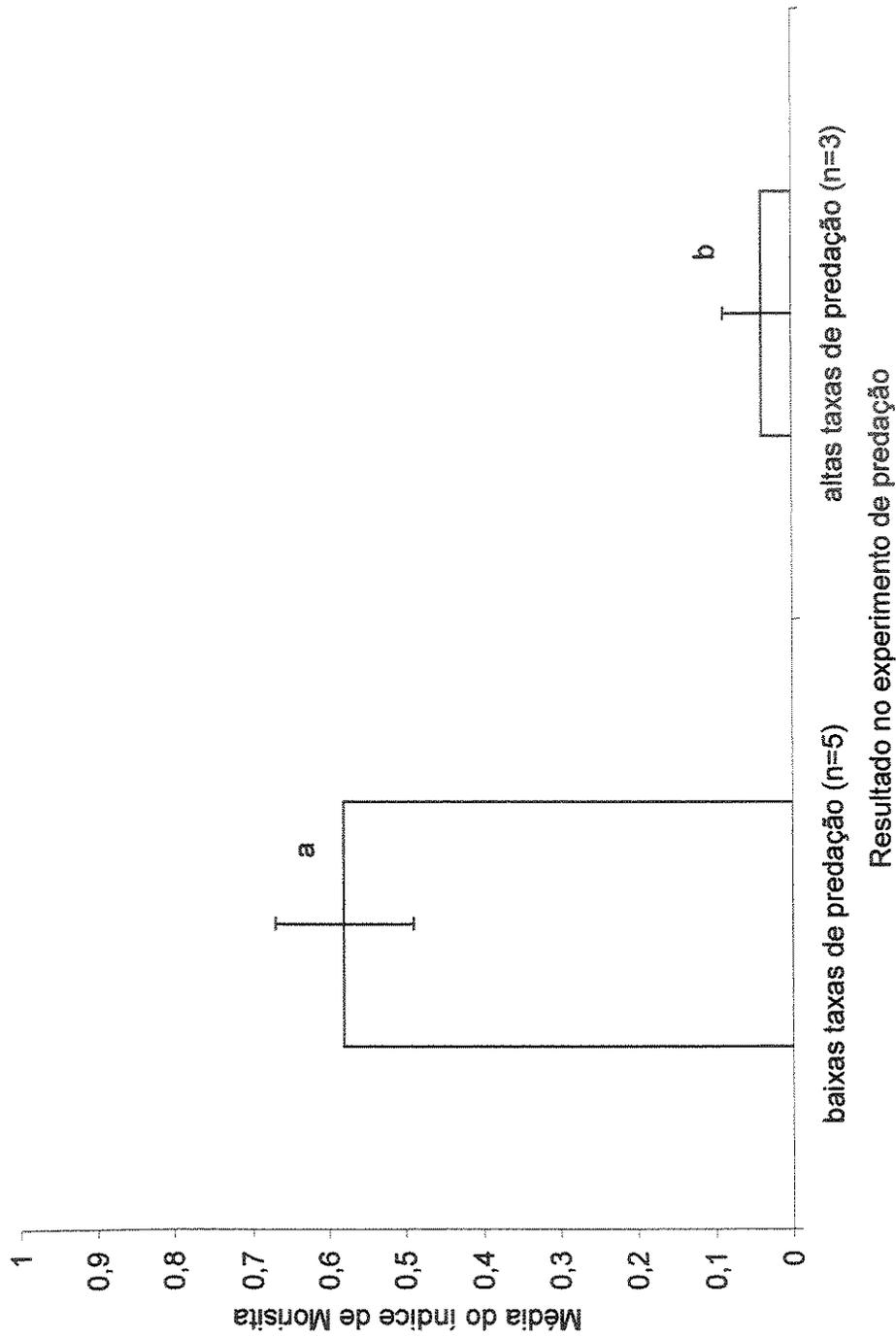


Figura 3.12. Médias \pm 1 desvio padrão do índice de Morisita de espécies com baixas e altas taxas de predação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (teste *t* de Student; $p < 0,05$). O n para baixas taxas indica as amostras de *Mechanitis polymnia* não testadas agrupadas com a amostra testada. O n para altas taxas indica as amostras das espécies com altas taxas de predação.

3.3.3. EXPERIMENTOS DE MUDANÇA DA SIMILARIDADE QUÍMICA ATRAVÉS DE MUDANÇA DA PLANTA HOSPEDEIRA

Em 15 experimentos realizados com larvas liofilizadas de *Mechanitis polymnia* alimentadas com *Solanum tabacifolium* e coladas em *Brugmansia suaveolens* (baixa similaridade) houve uma taxa de predação de 67% (Figura 3.13). Já nos 15 experimentos em que as larvas liofilizadas de *Mechanitis polymnia* foram coladas em folhas da mesma planta em que elas haviam se alimentado (*Solanum tabacifolium*) (alta similaridade) a taxa de predação foi de 27% (Figura 3.13).

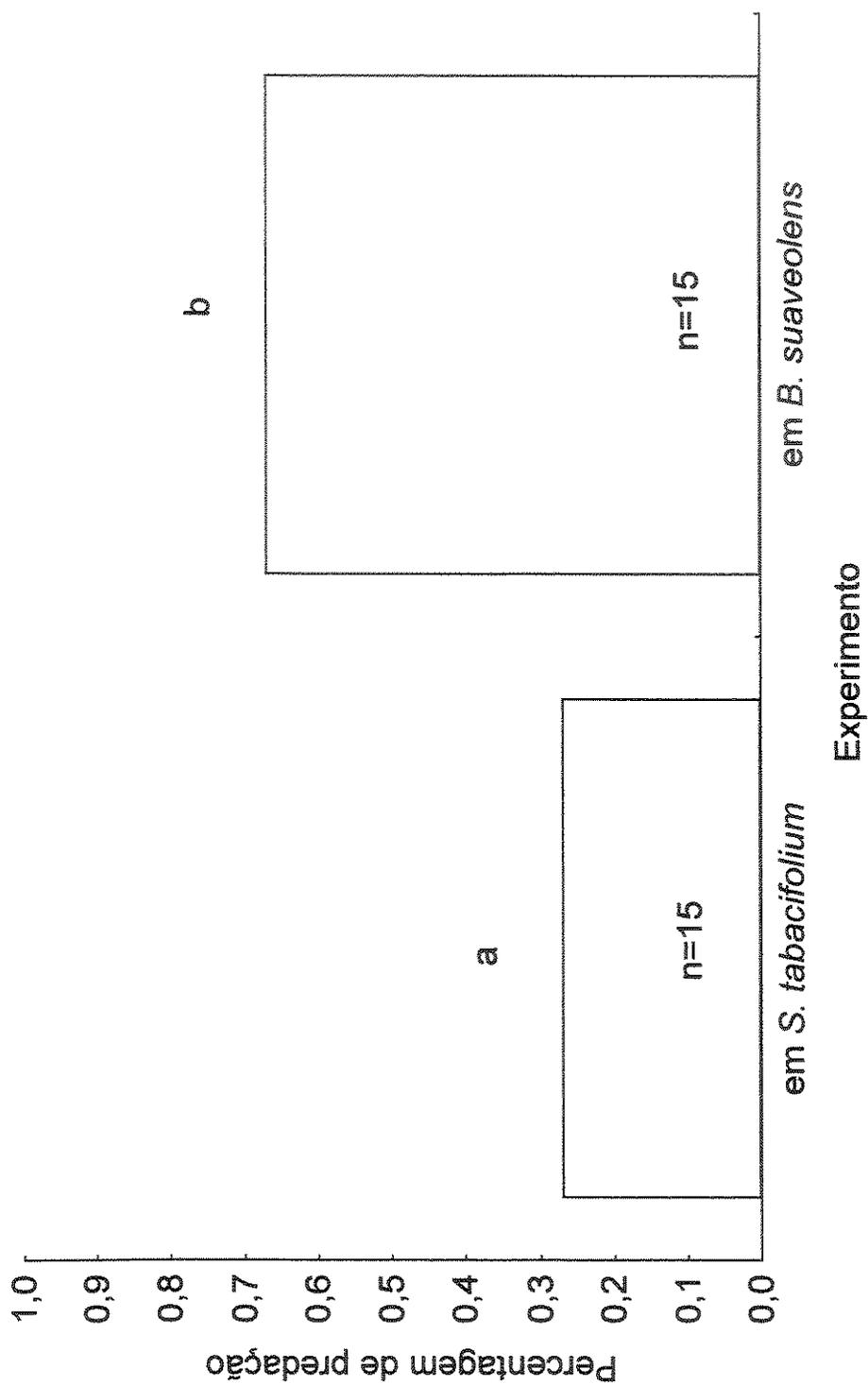


Figura 3.13. Porcentagem de predação de larvas liofilizadas de *Mechanitis polymnia* alimentadas com folhas de *Solanum tabacifolium* colocadas em diferentes plantas em experimentos de 24 horas de duração frente a *Camponotus crassus*. Letras diferentes indicam diferenças significativas (teste de χ^2 para homogeneidade de amostras binomiais; $p < 0,05$).

3.3.4. EXPERIMENTOS DE MUDANÇA DO PADRÃO QUÍMICO DE LIPÍDIOS CUTICULARES

As larvas experimentais de *Spodoptera frugiperda* que tiveram seu padrão químico alterado para se assemelharem ao padrão das folhas de *Solanum tabacifolium* (ALTA SIMILARIDADE) e que foram colocadas sobre esta mesma planta tiveram uma mediana do índice de visitação experimental de 20% (20% das visitas). Este valor foi significativamente menor do que a mediana de 46% dos índices de visitação controle (CONTROLE) obtidos nos seis experimentos controle realizados e também menor do que a mediana de 44% dos seis experimentos com larvas de *S. frugiperda* com padrão químico de *Solanum tabacifolium* colocadas em *Brugmansia suaveolens* (BAIXA SIMILARIDADE) (Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,01$) (Figura 3.14).

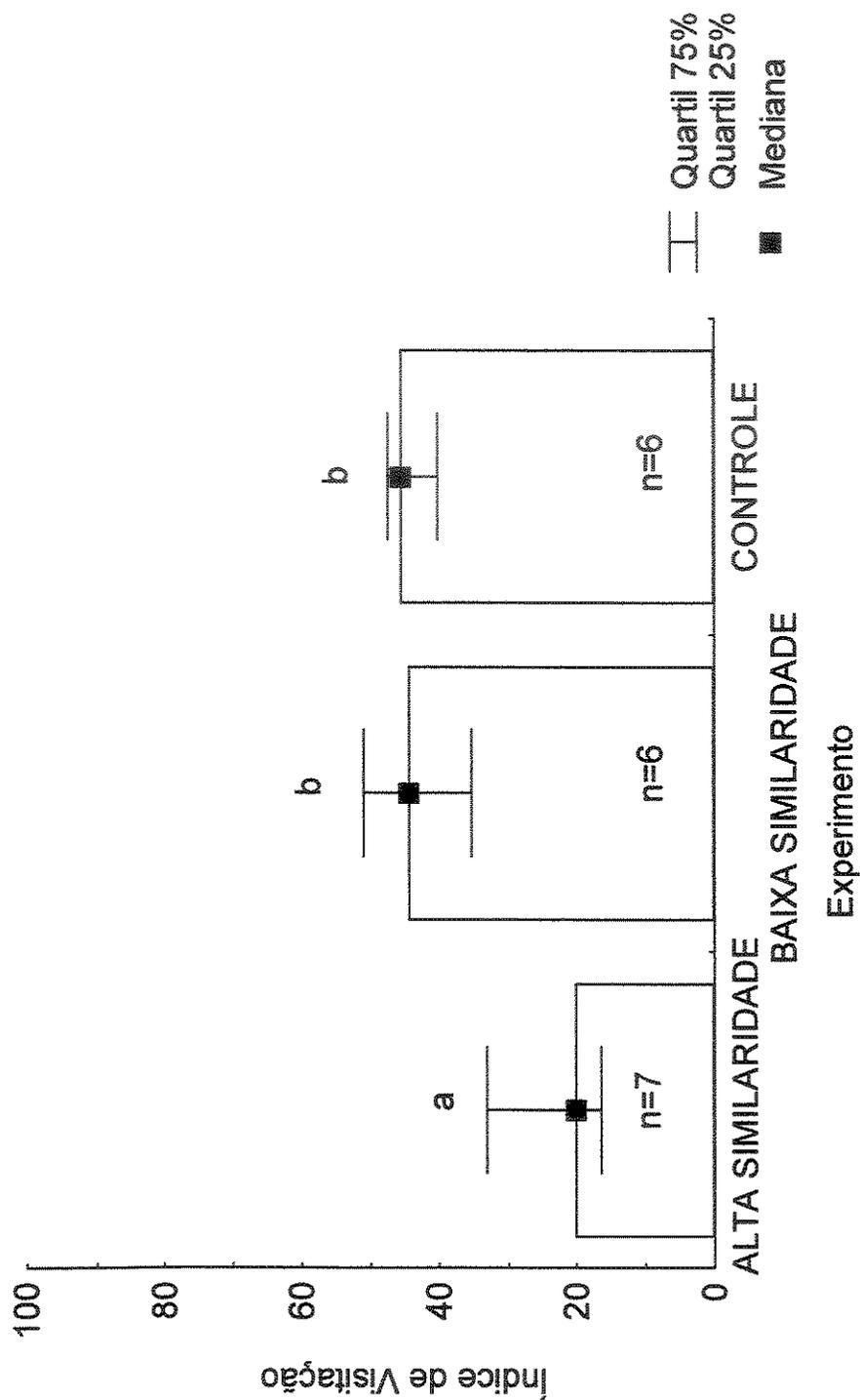


Figura 3.14. Índices de Visitação em larvas experimentais em *Solanum tabacifolium* (ALTA SIMILARIDADE - padrão químico da cutícula semelhante ao padrão da folha), em *Brugmansia suaveolens* (BAIXA SIMILARIDADE - padrão químico da cutícula diferente da folha) e *Solanum tabacifolium* (CONTROLE - padrão químico da cutícula diferente da folha). Letras diferentes indicam diferenças significativas (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,01$). Os números nas barras indicam o número de experimentos realizados.

3.3.5. SIMILARIDADE QUÍMICA ENTRE BORBOLETAS ITHOMIINAE E SUAS PLANTAS HOSPEDEIRAS

Os resultados obtidos com as estimativas dos índices de similaridade de Morisita para diversos lepidópteros e suas plantas hospedeiras dentro da subfamília Ithomiinae e o grupo irmão *Danaus* (Tabela 3.10) indicaram que ao menos duas espécies (*Dircenna dero* e *Mechanitis lysimnia*) poderiam estar utilizando a camuflagem química como estratégia de defesa da mesma forma que *Mechanitis polymnia*, mas experimentos necessitam ser realizados para confirmar tal estratégia nesses organismos. Os índices de similaridade destas duas espécies com suas plantas hospedeiras se encontram no mesmo nível dos índices obtidos para as amostras de *Mechanitis polymnia* (Tabela 3.9, item 3.3.2). As outras espécies apresentaram índices similares aos observados para *Methona themisto*, *Placidula euryanassa* e *Epityches eupompe*, que foram predadas por *Camponotus crassus* e, portanto, não devem apresentar a estratégia de camuflagem química.

Tabela 3.10. Índices de similaridade de Morisita para os padrões químicos das cutículas de lepidópteros e suas respectivas plantas hospedeiras.

Lepidóptero	Planta hospedeira	Índice de Morisita
<i>Danaus plexippus</i>	<i>Asclepias curassavica</i>	0,02
<i>Danaus gilippus</i>	<i>Asclepias curassavica</i>	0,16
<i>Dircenna dero</i>	<i>Solanum megalochiton</i>	0,56
<i>Episcada clausina</i>	<i>Solanum</i> sp2	0,03
<i>Epityches eupompe</i>	<i>Aureliana fasciculata</i>	0,00
<i>Hypothyris euclea</i>	<i>Solanum mauritianum</i>	0,00
<i>Ithomia drymo</i>	<i>Aureliana fasciculata</i>	0,06
<i>Mechanitis polymnia</i> – amostra 1	<i>Solanum tabacifolium</i>	0,59
<i>Mechanitis lysimnia</i>	<i>Solanum</i> sp3	0,62
<i>Methona themisto</i>	<i>Brunfelsia uniflora</i>	0,21
<i>Oleria</i> sp	<i>Aureliana fasciculata</i>	0,00
<i>Placidula euryanassa</i>	<i>Brugmansia suaveolens</i>	0,02
<i>Prittwitzia</i> sp	<i>Solanum</i> sp2	0,19
<i>Pseudoscada erruca</i>	<i>Solanum</i> sp2	0,06
<i>Pteronymia carlia</i>	<i>Solanum</i> sp2	0,11

3.4. DISCUSSÃO

Predação por Camponotus crassus em laboratório

O fato observado de algumas larvas de 5º estágio de *Placidula euryanassa* e *Methona themisto* não serem completamente consumidas pelas formigas, provavelmente ocorreu porque as larvas rapidamente ressecavam após serem mortas. As formigas então abandonavam-nas, possivelmente porque já se encontravam em estado impróprio para consumo. Isto foi observado somente em *Methona themisto* e *Placidula euryanassa* possivelmente porque estas foram as maiores larvas testadas e também porque *Placidula euryanassa*, apesar de não ser tão grande quanto *Methona themisto*, foi oferecida em grupos de cinco larvas. O maior tamanho das larvas nestas espécies faria com que as formigas levassem muito tempo para removê-las, em relação às outras espécies testadas (*Mechanitis polymnia* e *Epityches eupompe*), cujas larvas são menores. Outra possibilidade que causaria a rejeição das larvas de *Placidula euryanassa* seria uma sensibilidade das formigas aos alcalóides tropânicos presentes nesta espécie (Freitas et al. 1996). A mesma possibilidade existe para *Methona themisto*, uma vez que não se sabe se esta espécie seqüestra substâncias de defesa de sua planta hospedeira *Brunfelsia* sp. Trigo (com. pess.) observou que larvas de *Danaus plexippus*, as quais apresentam cardenolidas (revisão em Brower 1984), também eram mortas por *Camponotus crassus*, mas não eram consumidas. As formigas, quando atacavam essas larvas, apresentavam um comportamento conspicuo de limparem suas mandíbulas, sugerindo um possível gosto desagradável das cardenolidas.

A grande homogeneidade observada nas taxas de predação entre os estádios larvais de *Mechanitis polymnia* indica que os mecanismos anti-predação, tanto químicos quanto comportamentais, que conferem proteção contra *Camponotus crassus*, são extremamente eficientes em qualquer estágio larval. A ausência de predação observada em larvas de *Mechanitis polymnia* em laboratório está de acordo com o observado durante o acompanhamento no campo ($\approx 20\%$) onde as taxas de predação foram maiores em ovos e pupas (ver Capítulo I).

No caso de *Methona themisto*, *Epityches eupompe* e *Placidula euryanassa* os mecanismos de defesa anti-predação são inefetivos em todos os estádios larvais, incluindo o último estágio de desenvolvimento, que pode ser considerado o estágio mais capaz de defesa contra artrópodes predadores (Hayes 1981, Kristensen 1994).

É importante ressaltar que, apesar de todas as espécies testadas serem consideradas especialistas (sensu Bernays 1988) (ver Drummond & Brown 1987, Brown & Freitas 1994), apenas *Mechanitis polymnia* não foi predada por *Camponotus crassus*. Bernays (1988), trabalhando com 27 espécies de lepidópteros, observou que vespas *Mischocyttarus flavitarsus* predavam mais prontamente lagartas generalistas do que especialistas, em experimentos em laboratório onde larvas de espécies generalistas eram oferecidas ao mesmo tempo que larvas de espécies especialistas. Bernays & Cornelius (1989), trabalhando com 36 espécies de lepidópteros, observaram que larvas de espécies generalistas eram mais palatáveis do que especialistas para a formiga generalista *Iridomyrmex humilis*. Dyer & Floyd (1993), também trabalhando com 36 espécies de lepidópteros, encontraram uma maior probabilidade de predação por formigas

Paraponera clavata em larvas de espécies generalistas do que especialistas. Dyer (1995), trabalhando com 70 espécies de lepidópteros, também encontrou uma maior probabilidade de predação por formigas *Paraponera clavata* em larvas de lepidópteros generalistas do que especialistas.

Também interessante é o fato de *Methona themisto*, que claramente possui coloração de advertência, ter sido predada por *Camponotus crassus*. Bernays (1988) e Bernays & Cornelius (1989) observaram uma maior rejeição de larvas com coloração claramente de advertência por vespas e formigas, respectivamente. Estes autores, entretanto, não analisaram nenhum aspecto da química dos lepidópteros testados. Por outro lado, Dyer & Floyd (1993) e Dyer (1995) não observaram tendência de maior rejeição por formigas *Paraponera clavata* de larvas com coloração de advertência. Esta diferença com relação à predação de larvas com coloração de advertência pode ser causada por diferenças na sensibilidade do predador a possíveis compostos de defesa presentes nas larvas. Ainda, os experimentos foram realizados de forma diferente: Dyer & Floyd (1993) e Dyer (1995) fizeram experimentos de curta duração (máximo de duas horas) com larvas vivas, baseados no número de encontros formiga – larva; Bernays & Cornelius (1989) realizaram experimentos pareados com larvas mortas, também de curta duração (questão de minutos), baseados no número de formigas em contato com cada larva para o cálculo de um índice de preferência; Bernays (1988) fez experimentos pareados com larvas vivas, de relativa curta duração (máximo de seis horas), baseados no número de larvas removidas pelas vespas.

Os experimentos com *Camponotus crassus*, por outro lado, foram realizados durante 24 horas e com larvas não pareadas, havendo, portanto, um maior tempo para contato e manipulação de cada larva pelas formigas. Ainda, os experimentos foram realizados na arena de forrageamento dos ninhos em laboratório, ao contrário dos experimentos de Bernays & Cornelius (1989), Dyer & Floyd (1993) e Dyer (1995) que utilizaram trilhas de forrageamento das formigas no campo. Nas trilhas de forrageamento, as larvas eram colocadas a distâncias maiores da entrada do ninho (3m no caso de Dyer & Floyd 1993 e Dyer 1995) do que na arena de forrageamento dos ninhos de *Camponotus crassus* (de 10 a 20cm da entrada). Estes três fatores (tempo de exposição, pareamento e distância da entrada do ninho), provavelmente aumentaram as chances de *Camponotus crassus* predarem uma determinada larva, tornando o experimento conservador com relação à resposta de não predação obtida com *Mechanitis polymnia*. Por outro lado, o fato de as larvas terem sido oferecidas vivas e em folhas de suas plantas hospedeiras pode ter aumentado as chances de defesas das larvas contra *Camponotus crassus* relacionadas ao comportamento e/ou características da planta.

Quanto ao estilo de vida das larvas testadas (*Mechanitis polymnia*, *Methona themisto*, *Epityches eupompe* e *Placidula euryanassa*), se coloração conspícua ou críptica e se gregárias ou solitárias em suas combinações, não foi possível estabelecer relação entre os estilos de vida e possíveis estratégias de defesas anti-predação contra *Camponotus crassus*. Uma amostragem de um maior número de espécies é necessária para que seja possível verificar padrões de associação entre estas características e a palatabilidade para predadores

generalistas, como realizado por Bernays (1988), Bernays & Cornelius (1989), Dyer & Floyd (1993) e Dyer (1995).

Espelie et al. (1991) sugerem que uma das possíveis formas de defesa de insetos fitófagos contra predadores seja uma inconspicuidade química com relação aos lipídios cuticulares presentes nos fitófagos e em suas plantas hospedeiras. Uma alta similaridade química entre o fitófago e sua planta hospedeira poderia dificultar sua detecção por inimigos naturais que utilizam pistas químicas na localização de presas. *Mechanitis polymnia* poderia estar utilizando um mecanismo deste tipo na defesa contra *Camponous crassus*.

Similaridade química

As substâncias identificadas tanto nas plantas quanto nos lepidópteros, estão em concordância com as encontradas nestes grupos já descritas na literatura (Hadley 1981, Lockey 1988).

Os resultados da análise do padrão químico dos lipídios cuticulares de lepidópteros e plantas hospedeiras mostraram-se concordantes com a hipótese de camuflagem química proposta. Conforme era esperado pela hipótese, as larvas que demonstraram um baixo grau de similaridade entre o padrão químico de sua cutícula e o padrão de suas plantas hospedeiras (*Methona themisto*, *Epityches eupompe* e *Placidula euryanassa*) foram mais predadas por *Camponotus crassus*. Acredita-se que estas larvas tenham sido reconhecidas como presas por esta formiga. Por outro lado, larvas de *Mechanitis polymnia*, que demonstraram um alto grau de similaridade entre o padrão químico de sua cutícula e o padrão de suas plantas hospedeiras, não foram reconhecidas como presa por *Camponotus crassus* e quase não foram predadas.

As misturas de hidrocarbonetos cuticulares têm sido sugeridas como responsáveis pelo reconhecimento entre indivíduos de uma mesma colônia de formigas, causando interações agressivas entre indivíduos de colônias diferentes (revisões em Howard 1993, Hölldobler 1995). Por exemplo, Boulay et al. (2000) demonstraram, para *Camponotus fellah*, que indivíduos mantidos isolados apresentavam mudanças nos hidrocarbonetos cuticulares com o tempo. Quando estes indivíduos eram retornados aos ninhos de origem, passavam a ser rejeitados por indivíduos de sua própria colônia, que não mais os reconheciam como sendo da mesma colônia (Boulay et al. 2000). É possível que o reconhecimento de presas por *Camponotus crassus* também seja baseado em hidrocarbonetos cuticulares, da mesma forma que o reconhecimento de indivíduos do mesmo ninho descrito acima. Se isto for verdade é provável que os lipídios cuticulares de *Mechanitis polymnia* sejam os responsáveis pelo seu não reconhecimento como presa por *Camponotus crassus*.

Os bioensaios de diminuição no grau de similaridade do padrão químico de lipídios cuticulares de *Mechanitis polymnia* através da mudança da planta hospedeira foram decisivos na comprovação da hipótese de camuflagem química, visto que eles simulam da melhor maneira possível uma mudança na similaridade sem a variação dos outros fatores da larva, como comportamento, outros componentes químicos e estruturais da cutícula, ou extração/aplicação deficiente em modelos. Com estes experimentos, verificou-se que uma simples mudança na folha em que a larva se encontrava era responsável por uma mudança no comportamento das formigas em relação às larvas. As larvas passaram a sofrer

67% de mortalidade quando estavam em uma folha que não era sua planta hospedeira contra apenas 27% quando em folhas de sua planta hospedeira.

Os experimentos de mudança do padrão químico dos lipídios cuticulares de *Spodoptera frugiperda* foram úteis na comprovação do papel dos lipídios cuticulares no reconhecimento de uma larva como presa por parte de *Camponotus crassus*. Ao se demonstrar que a simples aplicação da fração lipídica da cutícula das folhas de *Solanum tabacifolium* era capaz de defender as larvas de *Spodoptera frugiperda* contra *Camponotus crassus*, fica indiscutível a importância destas substância no processo de reconhecimento de presas por parte desse predador. É importante salientar que as larvas de *Spodoptera frugiperda* estavam mortas durante os experimentos, não exibindo nenhum comportamento defensivo, da mesma forma que as larvas vivas de *Mechanitis polymnia*. O comportamento defensivo exibido por larvas normalmente predadas por *Camponotus crassus* pode ser uma característica decisiva na eficiência dos lipídios cuticulares como defesa, já que esta é aparentemente a única característica além da similaridade química que diferencia as larvas de *Mechanitis polymnia* das outras larvas estudadas.

A alta similaridade química no padrão de lipídios cuticulares entre insetos tem sido considerada um dos mecanismos que possibilitam a penetração em sociedades de insetos por parasitas sociais, sem que estes sejam reconhecidos como invasores e conseqüentemente mortos (revisões em Stowe 1989, Dettner & Liepert 1994, Singer 1998). Larvas da borboleta *Maculinea rebeli* (Lycaenidae) são parasitas sociais de colônias de formigas do gênero *Myrmica*. Quando atingem o quarto e último estágio de desenvolvimento, suas larvas se jogam de

sua planta hospedeira (*Gentiana cruciata*) caindo ao solo e, se encontradas por operárias de *Myrmica*, são levadas para o interior do seu ninho, onde são alimentadas como se fossem larvas das formigas por 10, 11 ou 23 meses (Elmes et al. 1991, Akino et al. 1999). Akino et al. (1999) demonstraram que as larvas de *Maculinea rebeli* produzem compostos da sua cutícula (principalmente hidrocarbonetos) que permitem que estas sejam tratadas como larvas das formigas por *Myrmica*.

Outros organismos se utilizam de estratégias semelhantes para escaparem à morte por formigas. Larvas de moscas sirfídeas do gênero *Microdon*, vespas eucharitídeas, besouros escarabeídeos e estafilínídeos e até mesmo outras formigas mimetizam quimicamente lipídios cuticulares de formigas e conseguem viver dentro de seus ninhos ganhando proteção e abrigo e em muitos casos são alimentados pelas próprias formigas (revisões em Dettner & Liepert 1994, Singer 1998). Larvas da mariposa *Acherontia atropos* parasitam colônias de abelhas melíferas (*Apis mellifera*) entrando em seus ninhos e se alimentando de néctar e mel (Moritz et al. 1991). Estes autores sugerem que as larvas conseguem passar despercebidas pelas abelhas através do mimetismo de substâncias químicas em sua cutícula (ácidos graxos saturados e insaturados) que são comuns também na cutícula das abelhas.

Além da similaridade entre o padrão químico de lipídios cuticulares de larvas e folhas de plantas hospedeiras, foi observada uma diferença entre o comportamento de espécies reconhecidas como presa (*Methona themisto*, *Epityches eupompe* e *Placidula euryanassa*) e o de *Mechanitis polymnia* (não reconhecida como presa). Larvas reconhecidas como presa foram mais

perturbadas pelo contato com as formigas do que *Mechanitis polymnia*. Em sistemas de manejo de pragas com utilização de controle biológico por predadores (*Orius insidiosus*, Hemiptera: Anthocoridae) foi observado que o comportamento diferenciado de larvas de mariposas (*Heliothis zea* e *Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera: Noctuidae) pode ser responsável por diferentes taxas de predação (Isenhour et al. 1989). Neste caso a maior movimentação das larvas causada pela alimentação em genótipos resistentes de milho levava a uma maior mortalidade das larvas. Em outro sistema, Iwao & Wellington (1970) observaram também uma maior taxa de predação de larvas mais ativas de *Malacosoma californicum pluviale* em relação a larvas menos ativas pelo predador *Podisus maculiventris* (Hemiptera). Esta diferença foi observada em larvas de quarto estágio, enquanto que em quinto estágio a diferença se invertia, porque a maior atividade das larvas era suficiente para evitar a predação (Iwao & Wellington 1970).

A constatação de que a similaridade no padrão de lipídios cuticulares de larvas e folhas de sua planta hospedeira é importante no reconhecimento de presas por *Camponotus crassus* gera imediatamente outras questões: qual seria o grau de similaridade necessário para que *Camponotus crassus* deixe de reconhecer uma determinada larva como presa? A similaridade deve ser quantitativa, em termos de abundância relativa, ou qualitativa em termos de presença e ausência? Outros mecanismos estão atuando sinergisticamente ou antagonisticamente com a similaridade, para promover o reconhecimento ou não de larvas como presa?

Nas amostras estudadas, as larvas de *Mechanitis polymnia* apresentaram uma alta variação no grau de similaridade entre seus lipídios cuticulares e os

lipídios de suas plantas hospedeiras, apesar de o padrão químico dos lipídios de suas plantas hospedeiras ser bastante constante. Caso a variação observada seja real, ela pode ter origem genética ou ambiental. A variação ambiental dificilmente foi a responsável pela variação, uma vez que os organismos são provenientes da mesma região, foram criados pela mesma pessoa, da mesma forma e em condições ambientais muito semelhantes apesar de não totalmente controladas. Contudo, a variação genética não pode ser descartada a princípio, pois não há dados suficientes para isto. Apesar disto, a causa mais provável da variação é o fato de que ao congelarem-se as larvas em estágio de pré-pupa, o tempo de desenvolvimento da metamorfose em que as larvas se encontravam não foi controlado. É possível que amostras diferentes tenham sido preparadas a partir de larvas em diferentes estágios da metamorfose. É razoável esperar-se que o padrão de lipídios cuticulares de um inseto se modifique a cada estágio de sua metamorfose, como já foi observado para larvas e adultos de besouros *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Cucujidae) por Howard et al. (1995). Este fator deverá ser investigado através de um estudo cinético da mudança na composição dos lipídios cuticulares de larvas durante o 5º estágio de desenvolvimento.

Aparentemente, a estratégia de defesa por camuflagem química contra predadores quimicamente orientados pelos lipídios cuticulares, não está correlacionada a outras estratégias de defesa contra predadores visualmente orientados. Caso a defesa contra predadores quimicamente orientados seguisse a mesma linha da defesa contra predadores visualmente orientados, seria esperado que *Epityches eupompe* também utilizasse a camuflagem química como

defesa, visto que esta espécie é considerada visualmente críptica durante a maior parte de seu desenvolvimento. Entretanto, observou-se que *Epityches eupompe* não utiliza a camuflagem química como defesa contra *Camponotus crassus*.

A estratégia de camuflagem química pode constituir uma dupla vantagem adaptativa para *Mechanitis polymnia*: a primeira seria a mais óbvia de que os indivíduos não são predados e sobrevivem mais do que se não tivessem algum mecanismo de defesa; uma outra vantagem seria em termos de defesas mais usuais. Nestas defesas, muitas vezes as larvas são obrigadas a alterar o seu forrageamento de forma a evitar ataques por inimigos naturais. No caso da camuflagem química, as larvas não têm necessidade de modificar sua estratégia de forrageamento para que seu mecanismo de defesa funcione de forma eficiente. Podem se alimentar normalmente, evitando efeitos indiretos na sobrevivência das larvas, devido à presença de predadores invertebrados (Stamp & Bowers 1991).

Vários autores identificam mecanismos de mimetismo e camuflagem químicos atuando em sistemas predador-presa ou parasita-hospedeiro (revisões em Stowe 1988, Dettner & Liepert 1994, Singer 1998). Sua nomenclatura, entretanto é um tanto confusa (Dettner & Liepert 1994), havendo apenas uma definição especificamente feita para os sistemas de camuflagem e mimetismo químicos (Howard et al. 1990).

O sistema estudado neste trabalho (*Mechanitis polymnia* e *Solanum tabacifolium*) pode ser classificado como camuflagem de acordo com Vane-Wright (1976). O organismo em questão (*Mechanitis polymnia*) simula características de um modelo (*Solanum tabacifolium*) que não são do interesse do operador (*Camponotus crassus*), fazendo com que o operador não perceba sua presença.

As folhas de *Solanum tabacifolium* (modelo) são um objeto desinteressante para *Camponotus crassus* (operador), já que não lhes proporciona alimento, abrigo ou qualquer outra vantagem. Portanto, *Mechanitis polymnia* pode ser classificada como quimicamente críptica, utilizando-se de um mecanismo de camuflagem química (camuflagem *sensu* Vane-Wright 1976).

Muitos outros trabalhos descritos na literatura são, aparentemente, semelhantes ao sistema estudado aqui (*Mechanitis polymnia*, *Solanum tabacifolium* e *Camponotus crassus*) (revisões em Stowe 1988, Dettner & Liepert 1994, Singer 1998, Haynes & Yeorgan 1999). Muitos destes sistemas têm sido descritos como casos em que ocorre camuflagem química, entretanto muitas vezes os autores não determinam claramente que tipo de definição de camuflagem estão usando ou os sistemas necessitam mais estudos, principalmente experimentais, para que a camuflagem seja realmente comprovada, como nos casos descritos por Buckner (1993). Um dos casos descritos na literatura que mais se identificaria com o sistema estudado de *Mechanitis polymnia* e *Camponotus crassus* é o caso descrito por Fishlyn & Phillips (1980) para um gastrópode herbívoro marinho (*Notoacmea paleacea*) que se alimenta de uma angiosperma marinha (*Phyllospadix scouleri*) e aparentemente está camuflado quimicamente devido a flavonóides contra uma estrela-do-mar (*Leptasterias hexactis*). Entretanto, este sistema não possui o conjunto de dados experimentais necessário para que seja comprovada a hipótese de camuflagem química em detrimento de outras hipóteses como impalatabilidade, por exemplo.

Similaridade química em outros Ithomiinae

A alta similaridade do padrão químico dos lipídios cuticulares de *Mechanitis lysimnia* e *Dircenna dero* em relação a suas respectivas plantas hospedeiras, pode indicar que estas espécies também utilizem um mecanismo de camuflagem químico, da mesma forma que *Mechanitis polymnia*. Por ser uma espécie filogeneticamente próxima a *Mechanitis polymnia* (Brown & Freitas 1994), era esperado que *Mechanitis lysimnia* também possuísse alta similaridade com sua planta hospedeira. Para *Dircenna dero*, entretanto, sua similaridade poderia ser causada simplesmente pelo contato acentuado das larvas com as folhas, visto ser uma espécie com o hábito de enrolar folhas (Brown & Freitas 1994). Se este for o caso, era esperado que *Episcada clausina* também apresentasse alta similaridade, visto que esta é a única outra espécie neste estudo que enrola folhas (Brown & Freitas 1994).

4. CONCLUSÃO

Ovos e pupas de *Mechanitis polymnia* não são bem defendidos no ambiente natural, sendo atacados por uma variedade de inimigos naturais. Suas larvas apresentam mecanismos de defesa eficientes contra predação no ambiente natural e principalmente contra *Camponotus crassus* em laboratório.

A baixa sobrevivência de *Methona themisto*, *Epityches eupompe* e *Placidula euryanassa* frente a *Camponotus crassus* parece estar relacionada à sua baixa similaridade química com suas respectivas plantas hospedeiras.

A alta similaridade de lipídeos cuticulares de *Mechanitis polymnia* é capaz de proteger suas larvas contra predadores quimicamente orientados, como *Camponotus crassus*.

Lipídios cuticulares são capazes de proteger larvas palatáveis de *Spodoptera frugiperda* quando em situação de alta similaridade.

Um mecanismo de camuflagem química de larvas de *Mechanitis polymnia* em folhas de *Solanum tabacifolium* parece ser o responsável pela defesa destas larvas contra *Camponotus crassus*.

5. BIBLIOGRAFIA

- Akino, T., Knapp, J.J., Thomas, J.A. & Elmes, G.W. (1999) Chemical mimicry and host specificity in the butterfly *Maculinea rebeli*, a social parasite of *Myrmica* ant colonies. *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**: 1419-1426.
- Attygalle, A.B. (1998) Microchemical techniques. Em "Methods in chemical ecology v. 1: chemical methods" Editores Millar, J.G. & Haynes, K.F. pp. 207-294, Chapman & Hall, New York.
- Bates, H.W. (1862) Contributions to an insect fauna of the Amazon valley. Lepidoptera: Heliconidae. *Trans. Linn. Soc.* **23**: 495-566.
- Berenbaum, M.R. & Miliczky, E. (1984) Mantids and milkweed bugs: efficacy of aposematic coloration against invertebrate predators. *Am. Midl. Nat.* **111**: 64-68.
- Bernays, E.A. (1988) Host specificity in phytophagous insects: selection pressure from generalist predators. *Entomol. exp. appl.* **49**: 131-140.
- Bernays, E.A. & Cornelius, M.L. (1989) Generalist caterpillar prey are more palatable than specialists for the generalist predator *Iridomyrmex humilis*. *Oecologia* **79**: 427-430.
- Boppré, M. (1990) Lepidoptera and pyrrolizidine alkaloids. Exemplification of complexity in chemical ecology. *J. Chem. Ecol.* **16**: 165-185.
- Boulay, R., Hefetz, A., Soroker, V. & Lenoir, A. (2000) *Camponotus fellah* colony integration: worker individuality necessitates frequent hydrocarbon exchanges. *Anim. Behav.* **59**: 1127-1133.
- Bowers, M.D. (1980) Unpalatability as a defense strategy of *Euphydryas phaeton* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Evolution* **34**: 586-600.

- Bowers, M.D. (1992) The evolution of unpalatability and the cost of chemical defense in insects. Em "*Insect chemical ecology: an evolutionary approach*", Editores Roitberg, B.D. & Isman, M.B. pp. 216-244, Chapman & Hall, New York.
- Bowers, M.D. (1993) Aposematic caterpillars: life-styles of the warningly colored and unpalatable. Em "*Caterpillars: ecological and evolutionary constraints on foraging*" Editores Stamp, N.E. & Casey, T.M. pp. 331-371, Chapman & Hall, New York.
- Bowers, M.D. & Larin, Z. (1989) Acquired chemical defense in the lycaenid butterfly, *Eumaeus atala* (Lycaenidae). *J. Chem. Ecol.* **15**: 1133-1146.
- Brower, L.P. (1984) Chemical defense in butterflies. Em "*The Biology of Butterflies*" Editores Vane-Wright, R.I. & Ackery, P.R. Symp. Royal Entomol. Soc. **11**. pp. 109-134, Academic Press, New York.
- Brown, K.S., Jr. (1977) Geographical patterns of evolution in neotropical Lepidoptera: differentiation of the species of *Melinea* and *Mechanitis* (Nymphalidae, Ithomiinae). *Syst. Entomol.* **2**: 161-197.
- Brown, K.S., Jr. (1984) Adult obtained pyrrolizidine alkaloids defend ithomiinae butterflies against a spider predator. *Nature* (London) **309**: 707-709.
- Brown, K.S., Jr. (1985) Chemical ecology of dehydropyrrolizidine alkaloids in adult Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Rev. Bras. Biol.* **44**: 435-460.
- Brown, K.S., Jr. (1987) Chemistry at Solanaceae/Ithomiinae interface. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **74**: 359-397.
- Brown, K.S., Jr. & Freitas, A.V.L. (1994) Juvenile stages of Ithomiinae: overview and systematics (Lepidoptera: Nymphalidae). *Tropical Lepidoptera* **5**: 9-20.

- Brown, K.S., Jr. & Vasconcellos-Neto, J. (1976) Predation on aposematic ithomiinae butterflies by tanagers (*Pipraeidea melanonota*). *Biotropica* 8: 136-141.
- Brown, K.S., Jr., Klitzke, C.F., Berlinferi, C. & Rubbo dos Santos, P.E. (1995) Neotropical swallowtails: chemistry of foodplant relationships, population ecology, and biosystematics. Em "*Swallowtail Butterflies: their ecology and evolutionary biology*", Editores Scriber, J.M., Tsubaki, Y. & Lederhouse, R.C., pp. 405-445. Gainesville/FL: Scientific Publishers.
- Brown, K.S., Jr., Trigo, J.R., Francini, R.B., Morais, A.B.B. & Motta, P.C. (1991) Aposematic insects on toxic host plants: Coevolution, colonization, and chemical emancipation. Em "*Plant-animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions*", Editores Price, P.W., Lewinsohn, T.M., Fernandes, G.W. & Benson, W.W., pp. 375-402, John Wiley & Sons, Interscience.
- Buckner, J.S. (1993) Cuticular polar lipids of insects. Em "*Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology*", Editores Stanley-Samuels, D.W. & Nelson, D.R., pp. 227-270. University of Nebraska Press.
- Campbell, R.W. & Torgersen, T.R. (1982) Some effects of predaceous ants on western spruce budworm pupae in north central Washington. *Environ. Entomol.* 11: 111-114.
- Campos, H. (1979) *Estatística experimental não-paramétrica*. 3ª Edição, Piracicaba.
- Clausen, C.P. (1940) *Entomophagous insects*. New York.

- Cornell, H.V. & Hawkins, B.A. (1995) Survival patterns and mortality sources of herbivorous insects: some demographic trends. *Am. Nat.* **145**: 563-593.
- Cornell, H.V., Hawkins, B.A. & Hochberg, M.E. (1998) Towards an empirically-based theory of herbivore demography. *Ecol. Entomol.* **23**: 340-349.
- Courtney, S.P. & Duggan A.E. (1983) The population biology of the orange tip butterfly *Anthocharis cardamines* in Britain. *Ecol. Entomol.* **8**: 271-281.
- Dejean, A. (1988) Memory effect on predatory behavior of *Odontomachus troglodytes* (Formicidae-Ponerinae). *Behaviour* **107**: 131-137.
- Dempster, J.P. (1967) The control of *Pieris rapae* with DDT: I. The natural mortality of the young stages of *Pieris*. *J. Appl. Ecol.* **4**: 485-500.
- Dempster, J.P. (1984) The natural enemies of butterflies. Em "*The Biology of Butterflies*" Editores Vane-Wright, R.I. & Ackery, P.R. Symp. Royal Entomol. Soc. **11**. pp. 97-104, Academic Press, New York.
- Dettner, K. & Liepert, C. (1994) Chemical mimicry and camouflage. *Annu. Rev. Entomol.* **39**: 129-54.
- van den Dool, H & Kratz, P.D. (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* **11**: 463-471.
- Drummond III, B.A. (1986) Coevolution of Ithomiinae butterflies and solanaceous plants. Em "*Solanaceae, biology and systematics*", Editor D'Arcy, W.G., Columbia Univ. Press, New York, pp. 307-327.
- Drummond III, B.A. & Brown, K.S., Jr. (1987) Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae): Summary of known larval foodplants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **74**: 341-358.

- Dussourd, D.E., Ubik, K., Harvis, C., Resch, J., Meinwald, J. & Eisner, T. (1988) Biparental defensive endowment of eggs with acquired plant alkaloid in the moth *Utetheisa ornatrix*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 5992-5996.
- Dyer, L.A. (1995) Tasty generalists and nasty specialists? Antipredator mechanisms in tropical lepidopteran larvae. *Ecology* **76**: 1483-1496.
- Dyer, L.A. & Bowers, M.D. (1996) The importance of sequestered iridoid glycosides as a defense against an ant predator. *J. Chem. Ecol.* **22**: 1527-1539.
- Dyer, L.A. & Floyd, T. (1993) Determinants of predation on phytophagous insects: the importance of diet breadth. *Oecologia* **96**: 575-582.
- Edmunds, M.E. (1976) Larval mortality and population regulation in the butterfly *Danaus chrysippus* in Ghana. *Zool. J. Linn. Soc.* **58**: 129-145.
- Ehrlich, P.R. (1984) The structure and dynamics of butterfly populations. In "The Biology of Butterflies" Editores Vane-Wright, R.I. & Ackery, P.R. Symp. Royal Entomol. Soc. **11**. pp. 25-40, Academic Press, New York.
- Ehrlich, P.R. & Gilbert, L.E. (1973) Population structure and dynamics of the tropical butterfly *Heliconius ethilla*. *Biotropica* **5**: 69-82.
- Elmes, G.W., Thomas, J.A. & Wardlaw, J.C. (1991) Larvae of *Maculinea rebeli*, a large-blue butterfly, and their *Myrmica* host ants: wild adoption and behaviour in ant-nests. *J. Zool. Lond.* **223**: 447-460.
- Endler, J.A. (1981) An overview of the relationships between mimicry and crypsis. *Biol. J. Linn. Soc.* **16**: 25-31.

- Endler, J.A. (1991) Interactions between predators and prey. Em "*Behavioural ecology: an evolutionary approach*" Editores Krebs, J.R. & Davies, N.B., Blackwell Science, pp. 169-196.
- Espelie, K.E., Bernays, E.A. & Brown, J.J. (1991) Plant and insect cuticular lipids serve as behavioral cues for insects. *Arch. Insect Bioch. Physiol.* **17**: 223-233.
- Feeny, P., Blau, W.S. & Kareiva, P.M. (1985) Larval growth and survivorship of the black swallowtail butterfly in central New York. *Ecol. Monogr.* **55**: 167-187.
- Ferraz, J.M.G. (1991) *Estudos bioecológicos sobre Spodoptera frugiperda (Abbot e Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) como subsídio ao manejo integrado de pragas na cultura do milho*. Tese de Doutorado. UNICAMP. Campinas, SP.
- Fishlyn, D.A. & Phillips, D.W. (1980) Chemical camouflaging and behavioral defenses against a predatorty seastar by three species of gastropods from the surfgrass *Phyllospadix* community. *Biol. Bull.* **158**: 34-48.
- Freitas, A.V.L. (1996) Population biology of *Heterossais edessa* (Nymphalidae) and its associated atlantic forest Ithomiinae community. *J. Lepid. Soc.* **50**: 273-289.
- Freitas, A.V.L. & Oliveira, P.S. (1996) Ants as selective agents on herbivore biology: effects on the behaviour of a non-myrmecophilous butterfly. *J. Anim. Ecol.* **65**: 205-210.

- Freitas, A.V.L., Trigo, J.R., Brown, K.S., Jr., Witte, L., Hartmann, T. & Barata, L.E.S. (1996). Tropane and pyrrolizidine alkaloids in the ithomiines *Placidula euryanassa* and *Miraleria cymothoe* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Chemoecology* 7:61-67.
- Hadley, N.F. (1981) Cuticular lipids of terrestrial plants and arthropods: a comparison of their structure, composition, and waterproofing function. *Biol. Rev.* 56: 23-47.
- Harborne, J.B. (1986) Systematic significance of variations in defense chemistry in the Solanaceae. Em "*Solanaceae, biology and systematics*", Editor D'Arcy, W.G., Columbia Univ. Press, New York, pp. 328-344.
- Hare, J.F. & Eisner, T. (1993) Pyrrolizidine alkaloid deters ant predators of *Utetheisa oratrix* eggs: effects of alkaloid concentration, oxidation state, and prior exposure of ants to alkaloid-laden prey. *Oecologia* 96: 9-18.
- Harvey, P.H., Bull, J.J., Pemberton, M. & Paxton, R.J. (1982) The evolution of aposematic coloration in distasteful prey: a family model. *Am. Nat.* 119: 710-719.
- Haverty, M.I., Thorne, B.L. & Nelson, L.J. (1996) Hydrocarbons of *Nasutitermes acajutlae* and comparison of methodologies for sampling cuticular hydrocarbons of caribbean termites for taxonomic and ecological studies. *J. Chem. Ecol.* 22: 2081-2110.
- Hayes, J.L. (1981) The population ecology of a natural population of the pierid butterfly *Colias alexandra*. *Oecologia* 49: 188-200.
- Haynes, K.F. & Yeorgan, K.V. (1999) Exploitation of intraspecific communication systems: illicit signalers and receivers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92: 960-970.

- Heath, R.R. & Dueben, B.D. (1998) Analytical and preparative gas chromatography. Em "*Methods in chemical ecology v. 1: chemical methods*" Editores Millar, J.G. & Haynes, K.F. pp. 85-126, Chapman & Hall, New York.
- Hölldobler, B. (1995) The chemistry of social regulation: multicomponent signals in ant societies. Em "*Chemical ecology: the chemistry of biotic interaction*", editores Eisner, T. & Meinwald, J., National Academy Press, Washington, D.C., pp. 41-50.
- Howard, R.W. (1993) Cuticular hydrocarbons and chemical communication. Em "*Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology*", Editores Stanley-Samuelson, D.W. & Nelson, D.R., pp. 179-226. University of Nebraska Press.
- Howard, R.W. & Blomquist, G.J. (1982) Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. *Ann. Rev. Entomol.* **27**: 149-172.
- Howard, R.W., Akre, R.D. & Garnett, W.B. (1990) Chemical mimicry in an obligate predator of carpenter ants (Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **83**: 607-616.
- Howard, R.W. , Howard, C.D. & Colquhoun, S. (1995) Ontogenetic and environmental induced changes in cuticular hydrocarbons of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Cucujidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **88**: 485-495.
- Howard, R.W., McDaniel, C.A. & Blomquist, G.J. (1980) Chemical mimicry as an integrating mechanism: cuticular hydrocarbons of a termitophile and its host. *Science* **210**: 431-433.

- Hunziker, A.T. (1979) South American Solanaceae: a synoptic survey. Em "*The biology and taxonomy of the Solanaceae*" Editores Hawkes, J.G., Lester, R.N. & Skelding, A.D. pp. 49-85. Academic Press, London.
- Isenhour, D.J., Wiseman, B.R. & Layton, R.C. (1989) Enhanced predation by *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) on larvae of *Heliothis zea* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by prey feeding on resistant corn genotypes. *Environ. Entomol.* **18**: 418-422.
- Iwao, S. & Wellington, W.G. (1970) The influence of behavioral differences among tent-caterpillar larvae on predation by a pentatomid bug. *Can. J. Zool.* **48**: 896-898.
- Jones, R.E. (1987) Ants, parasitoids, and the cabbage butterfly *Pieris rapae*. *J. Anim. Ecol.* **56**: 739-749.
- Jones, R.E., Nealis, V.G., Ives, P.M. & Scheermeyer, E. (1987) Seasonal and spatial variation in juvenile survival of the cabbage butterfly *Pieris rapae*: evidence for patchy density-dependence. *J. Anim. Ecol.* **56**: 723-737.
- Kingsolver, J.G. (1985) Butterfly thermoregulation: organismic mechanisms and population consequences. *J. Res. Lepidop.* **24**: 1-20.
- Kingsolver, J.G. (1989) Weather and the population dynamics of insects: integrating physiological and population ecology. *Physiol. Zool.* **62**: 314-334.
- Kleinbaum, D.G. (1996) *Survival analysis: a self learning text*. Springer-Verlag, New York.

- Klitzke, C.F. (1992) *Ecologia química e coevolução na interface Troidini (Papilionidae)/Aristolochia (Aristolochiaceae)*. Dissertação (Mestrado), UNICAMP, Campinas, SP.
- de Kraker, J., van Huis, A., Heong, K.L., van Lenteren, J.C. & Rabbinge, R. (1999) Population dynamics of rice leaffolders (Lepidoptera: Pyralidae) and their natural enemies in irrigated rice in the Philippines. *Bull. Entomol. Res.* **89**: 411-421.
- Krebs, C.J. (1989) *Ecological methodology*. Harper Collins, New York. 654pp.
- Kristensen, C.O. (1994) Investigations on the natural mortality of eggs and larvae of the large white *Pieris brassicae* (L.) (Lep., Pieridae). *J. Appl. Ent.* **117**:92-98.
- Kusnezov, N. (1951) El género *Camponotus* en la Argentina. *Acta Zoologica Lilloana XII*: 183-255.
- Lamas, G. (1979) *Paititia neglecta*, gen. n., sp. n. from Perú (Nymphalidae: Ithomiinae). *J. Lepid. Soc.* **33**: 1-5.
- Lange, C. Basselier, J.-J., Bagnères, A.-G., Escoubas, P., Lemaire, M., Lenoir, A., Clement, J.-L., Bonavita-Cougourdan, A., Trabalon, M. & Campan, M. (1989) Strategy for the analysis of cuticular hydrocarbon waxes from insects using gas chromatography/mass spectrometry with electron impact and chemical ionization. *Biom. Environ. Mass Spectr.* **18**: 787-800.
- Lockey, K.H. (1988) Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.* **89B**: 595-645.
- Malcolm, S.B. (1990) Mimicry: status of a classical evolutionary paradigm. *TREE* **5**: 57-62.

- Monteiro, R.F. (1981) Regulação populacional em Ithomiinae (Lep.: Nymphalidae): ecologia da interação parasitóide x hospedeiro. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP.
- Montllor, C.B., Bernays, E.A. & Cornelius, M.L. (1991) Responses of two hymenopteran predators to surface chemistry of their prey: significance for an alkaloid-sequestering caterpillar. *J. Chem. Ecol.* **17**: 391-400.
- Moore, R.A. (1987) *Patterns and consequences of within population variation in reproductive strategies*. Dissertation. The University of Texas at Austin, Austin, Texas, USA *apud* Moore 1989.
- Moore, S.D. (1989) Patterns of juvenile mortality within an oligophagous insect population. *Ecology* **70**: 1726-1737.
- Morais, A.B.B. (1997) *Interações tritróficas no sistema Aristolochia arcuata (Aristolochiaceae), Battus polydamas (Lepidoptera: Papilionidae: Troidini), e alguns de seus inimigos naturais*. Tese de Doutorado, UNICAMP.
- Moritz, R.F.A., Kirchner, W.H. & Crewe, R.M. (1991) Chemical camouflage of the Death's Head Hawkmoth (*Acherontia atropos* L.) in honeybee colonies. *Naturwissenschaften* **78**: 179-182.
- Nash, R.J., Rothschild, M., Porter, E.A., Watson, A.A., Waigh, R.D. & Waterman, P.G. (1993) Calystegines in *Solanum* and *Datura* species and the death-head hawk-moth. *Phytochemistry* **34**: 1281-1283.
- Nelson, D.R. (1978) Long-chain methyl-branched hydrocarbons: Occurrence, biosynthesis and function. *Adv. Insect Physiol.* **13**: 1-33.

- Nelson, D.R. & Sukkestad, D.R. (1970) Normal and branched aliphatic hydrocarbons from the eggs of the tobacco hornworm. *Biochemistry* **9**: 4601-4610.
- Ohsaki, N. & Sato, Y. (1994) Food plant choice of *Pieris* butterflies as a trade-off between parasitoid avoidance and quality of plants. *Ecology* **75**: 59-68.
- Orr, A.G., Trigo, J.R., Witte, L. & Hartmann, T. (1996) Sequestration of pyrrolizidine alkaloids by larvae of *Tellervo zoilus* (Lepidoptera: Ithomiinae) and their role in the chemical protection of adults against the spider *Nephila maculata* (Araneidae). *Chemoecology* **7**:68-73.
- Pasteur, G. (1982) A classificatory review of mimicry systems. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **13**: 169-199.
- Peterson, S.C., Johnson, N.D. & LeGuyader, J.L. (1987) Defensive regurgitation of allelochemicals derived from host cyanogenesis by eastern tent caterpillars. *Ecology* **68**: 1268-1272.
- Price, P.W. (1980) Evolutionary biology of parasites, pp. 15-43. Em "*Monographs in population biology*" vol. 15, Editor May, R.M., Princeton University Press, Princeton.
- Reichstein, T., Von Euw, J., Parsons, J.A. & Rothschild, M. (1968) Heart poisons in the monarch butterfly. *Science* **161**: 861-866.
- Ruszczuk, A. (1986) Mortality of *Papilio scamander scamander* (Lep., Papilionidae) pupae in four districts of Porto Alegre (S. Brazil) and the causes of superabundance of some butterflies in urban areas. *Rev. Brasil. Biol.* **46**: 567-579.

- Schreiber, K. (1979) The steroid alkaloids of *Solanum*. Em "*The biology and taxonomy of the Solanaceae*" Editores Hawkes, J.G., Lester, R.N. & Skelding, A.D. pp. 193-202. Academic Press, London.
- Silva, K.L. (2000) *Alcalóides pirrolizidínicos utilizados por insetos na defesa química contra predadores vertebrados e invertebrados*. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biologia, UNICAMP, 152pp.
- Sillén-Tullberg, B. (1988) Evolution of gregariousness in aposematic butterfly larvae: a phylogenetic analysis. *Evolution* **42**: 293-305.
- Singer, T.L. (1998) Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *Amer. Zool.* **38**: 394-405.
- Smiley, J.T. (1985) *Heliconius* caterpillars mortality during establishment on plants with and without attending ants. *Ecology* **67**: 516-521.
- Snedecor, G.W. & Cochran, W.G. (1989) *Statistical Methods*. 8ª edição, Iowa State University Press, Ames, Iowa. 503pp.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1995) *Biometry*. 3ª edição, W. H. Freeman & Company, New York. 887pp.
- Stamp, N.E. & Bowers, M.D. (1991) Indirect effect on survivorship of caterpillars due to presence of invertebrate predators. *Oecologia* **88**: 325-330.
- Stamp, N.E. & Wilkens, R.T. (1993) On the cryptic side of life: being unapparent to enemies and the consequences for foraging and growth of caterpillars. Em "*Caterpillars: ecological and evolutionary constraints on foraging*" Editores Stamp, N.E. & Casey, T.M. pp. 283-330, Chapman & Hall, New York.
- Starrett, A. (1993) Adaptive resemblance: a unifying concept for mimicry and crypsis. *Biol. J. Linn. Soc.* **48**: 299-317.

- Stiling, P.D. (1988) Density-dependent processes and key factors in insect populations. *J. Anim. Ecol.* **57**: 581-593.
- Stowe, M.K. (1988) Chemical Mimicry. Em "*Chemical Mediation of Coevolution*", Editor Spencer, K.C. pp: 513-580.
- Trigo, J.R. (1988). *Ecologia Química na Interface Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae)/Echitoideae (Apocynaceae: Angiospermae)*. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biologia, UNICAMP, 196pp.
- Trigo, J.R. (1993) *Alcalóides pirrolizidínicos em borboletas Ithomiinae. Alguns aspectos em ecologia química*. Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, 358pp.
- Trigo, J.R. (2000) The chemistry of antipredator defense by secondary compounds in neotropical aposematic Lepidoptera: facts, perspectives and caveats. *J. Braz. Chem. Soc.* **11**: 551-561.
- Trigo, J.R. & Brown, K.S., Jr. (1990) Variation of pyrrolizidine alkaloids in Ithomiinae: a comparative study between species feeding on Apocynaceae and Solanaceae. *Chemoecology* **1**: 22-29.
- Trigo, J.R. & Chemin, N. (1996) Pyrrolizidine alkaloids in chemical protection against a spider predator. I. Preliminary studies on free bases and N-oxides. Em "*Techniques in plant-insect interactions and biopesticides*", Editor Niemeyer, H., International Foundation of Science, Stockholm, Suécia, pp. 158-161.
- Trigo, J.R., Witte, L., Brown, K.S., Jr., Hartmann, T. & Barata, L.E.S. (1993) Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. *J. Chem. Ecol.* **19**: 669-679.

- Trigo, J.R., Brown, K.S., Jr., Witte, L., Hartmann, T., Ernst, L. & Barata, L.E.S. (1996a) Pyrrolizidine alkaloids: different acquisition and use patterns in Apocynaceae and Solanaceae feeding ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biol. J. Linn. Soc.* **58**:99-123.
- Trigo, J.R., Brown, K.S., Jr., Henriques, S.A. & Barata, L.E.S. (1996b) Qualitative pattern of pyrrolizidine alkaloids in Ithomiinae butterflies. *Biochem. Syst. Ecol.* **24**: 181-188.
- Turner, J.R.G. (1984) Mimicry: the palatability spectrum and its consequences. Em "*The Biology of Butterflies*" Editores Vane-Wright, R.I. & Ackery, P.R. Symp. Royal Entomol. Soc. **11**. pp. 141-161, Academic Press, New York.
- Vane-Wright, R.I. (1976) A unified classification of mimetic resemblances. *Biol. J. Linn. Soc.* **8**: 25-56.
- Vasconcellos-Neto, J. (1980) *Dinâmica de populações de Ithomiinae (Lep.: Nymphalidae) em Sumaré-SP*. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP.
- Vasconcellos-Neto, J. (1986) Interactions between Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae) and Solanaceae. Em "*Solanaceae, biology and systematics*", Editor D'Arcy, W.G., Columbia Univ. Press, New York, pp.364-377.
- Vasconcellos-Neto, J & Monteiro, R.F. (1993) Inspection and evaluation of host plant by the butterfly *Mechanitis lysimnia* (Nymph., Ithomiinae) before laying eggs: a mechanism to reduce intraspecific competition. *Oecologia* **95**: 431-438.

- Weseloh, R.M. (1993) Potential effects of parasitoids on the evolution of caterpillar foraging behavior. Em "*Caterpillars: ecological and evolutionary constraints on foraging*" Editores Stamp, N.E. & Casey, T.M. pp. 203-223, Chapman & Hall, New York.
- Witz, B. (1990) Antipredator mechanisms in arthropods: a twenty year literature survey. *Florida Entomol.* **73**: 71-99.
- Wolda, H. (1981). Similarity indices, sample size and diversity. *Oecologia* (Berl) **50**: 296-302.
- Young, A.M. (1972) On the life cycle and natural history of *Hymenitis nero* (Lepidoptera: Ithomiinae) in Costa Rica. *Psyche* **79**: 284-294.
- Young, A.M. (1973) The life cycle of *Dircenna relata* (Ithomiidae) in Costa Rica. *J. Lepid. Soc.* **27**: 258-267.
- Young, A.M. (1974a) Notes on the biology of *Pteronymia notilla* (Ithomiidae) in a Costa Rican mountain rain forest. *J. Lepid. Soc.* **28**: 257-268.
- Young, A.M. (1974b) A natural historical account of *Oleria zelica pagasa* (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae) in a Costa Rican mountain rain forest. *Stud. Neotrop Fauna* **9**: 123-140.
- Young, A.M. (1974c) On the biology of *Godyris zavaleta caesiopicta* (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). *Entomol. News* **85**: 227-238.
- Young, A.M. (1978a) The biology of the butterfly *Aeria eurimedea agna* (Nymphalidae: Ithomiinae: Oleriini) in Costa Rica. *J Kansas Entomol. Soc.* **51**: 1-10.

- Young, A.M. (1978b) Notes on the biology of the butterfly *Hypoleria cassotis* (Bates) (Nymphalidae: Ithomiinae) in northeastern Costa Rica. *Brenesia* 14-15: 97-108.
- Young, A.M. (1978c) "Disappearances" of eggs and larvae of *Heliconius* butterflies (Nymphalidae: Heliconiinae) in northeastern Costa Rica. *Entomol. News* 89: 81-87.
- Young, A.M. (1979) Weather and the regulation of *Hypothyris euclea* (Nymphalidae): populations in northeastern Costa Rica. *J. Lepid. Soc.* 33: 68-69.
- Young, A.M. & Moffett, M.W. (1979a) Studies on the population biology of the tropical butterfly *Mechanitis isthimia* in Costa Rica. *Am. Mid. Nat.* 101: 309-319.
- Young, A.M. & Moffett, M.W. (1979b) Behavioral mechanisms in populations of the butterfly *Mechanitis isthmia* in Costa Rica: Adaptations to host plants in secondary and agricultural habitats. *Deutsch. Entomol. Zeitschr.* 26: 21-38.
- Young, H.P. & Schal, C. (1997) Cuticular hydrocarbon synthesis in relation to feeding and developmental stage in nymphs of *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90: 655-663.
- Zalucki, M.P. & Kitching, R.L. (1982) Temporal and spatial variation of mortality in field populations of *Danaus plexippus* L. and *D. chrysippus* L. larvae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Oecologia* 53: 201-207.

6. APÊNDICES

6.1. APÊNDICE I

ESPECTROS DE MASSAS DE SUBSTÂNCIAS NÃO IDENTIFICADAS EM *MECHANITIS POLYMNIA* – AMOSTRA 1 E *SOLANUM TABACIFOLIUM*

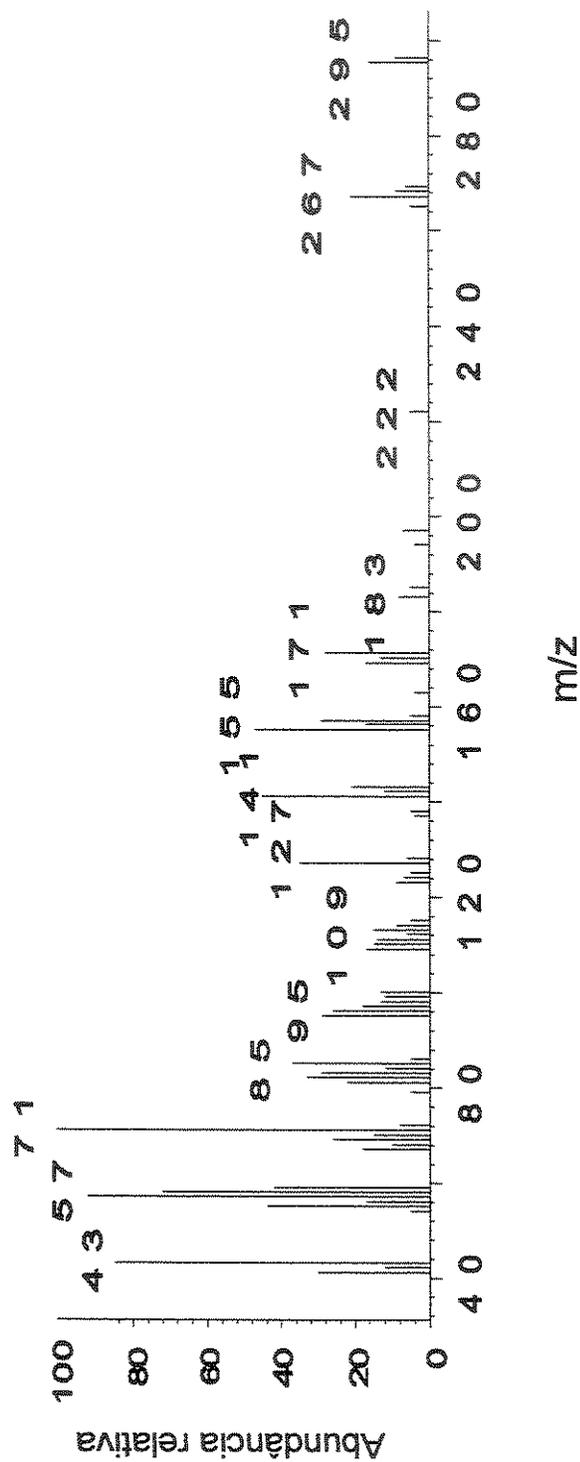


Figura 6.1. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 5 Tabela 3.4 e Figura 3.7.

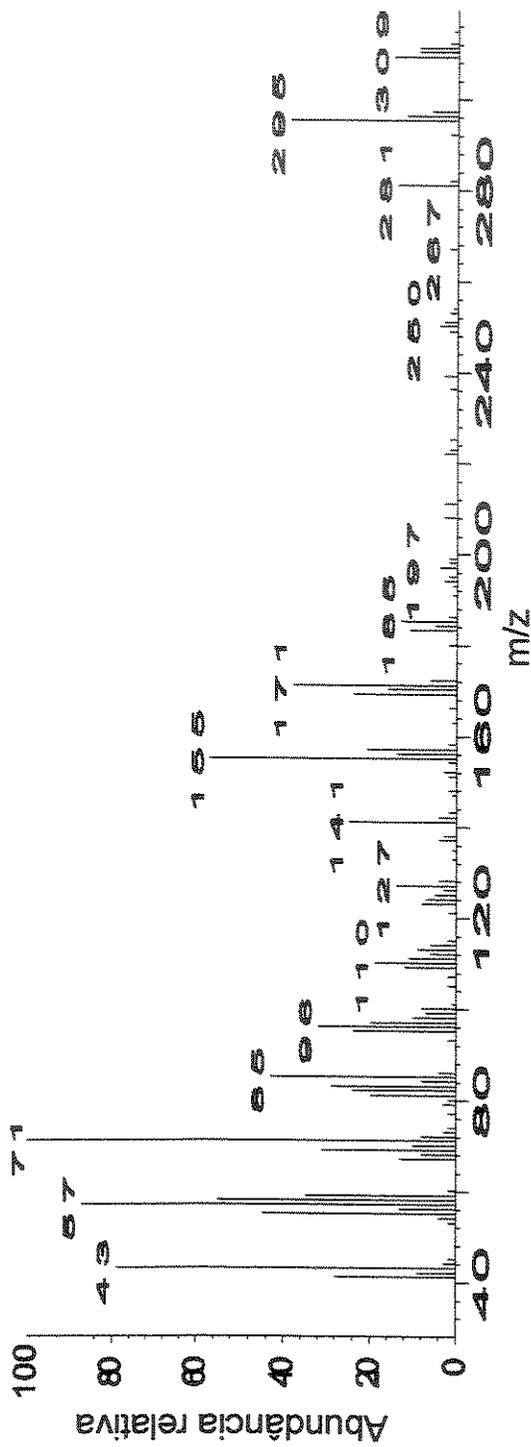


Figura 6.2. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 9 Tabela 3.4 e Figura 3.7.

6.2. APÊNDICE II

ESPECTROS DE MASSAS DE SUBSTÂNCIAS NÃO IDENTIFICADAS EM *METHONA THEMISTO* E *BRUNFELSIA UNIFLORA*

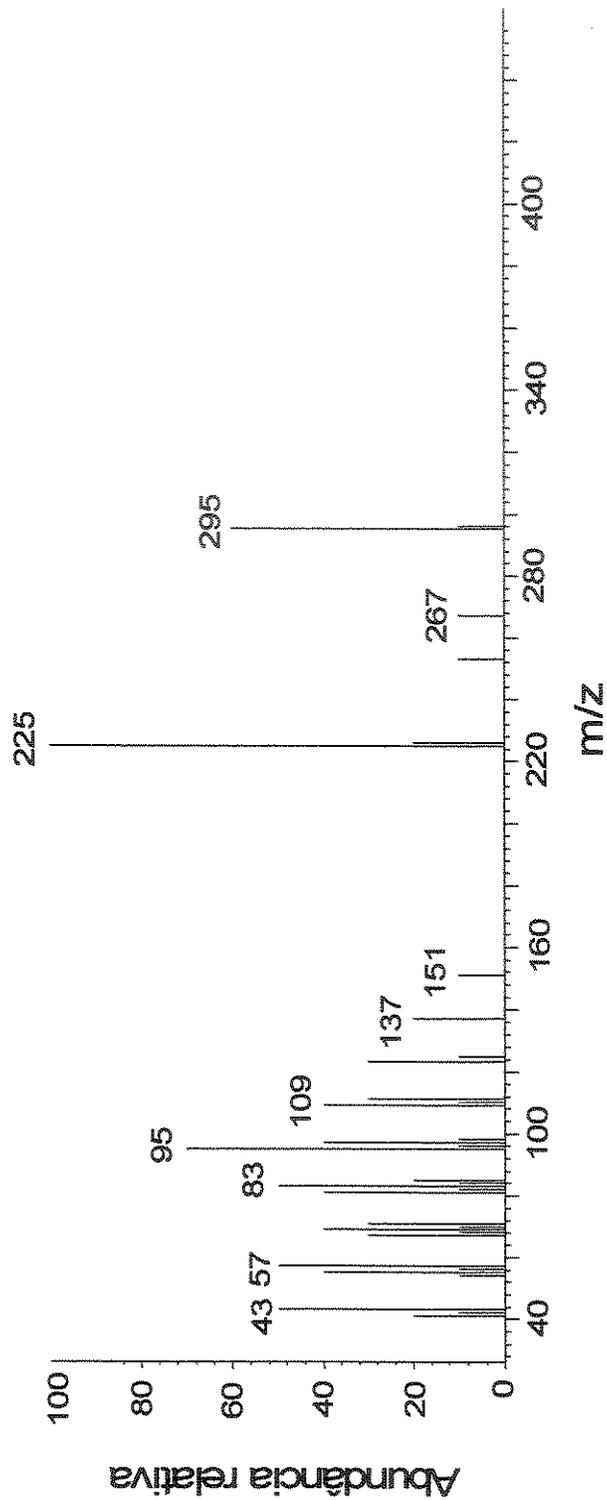
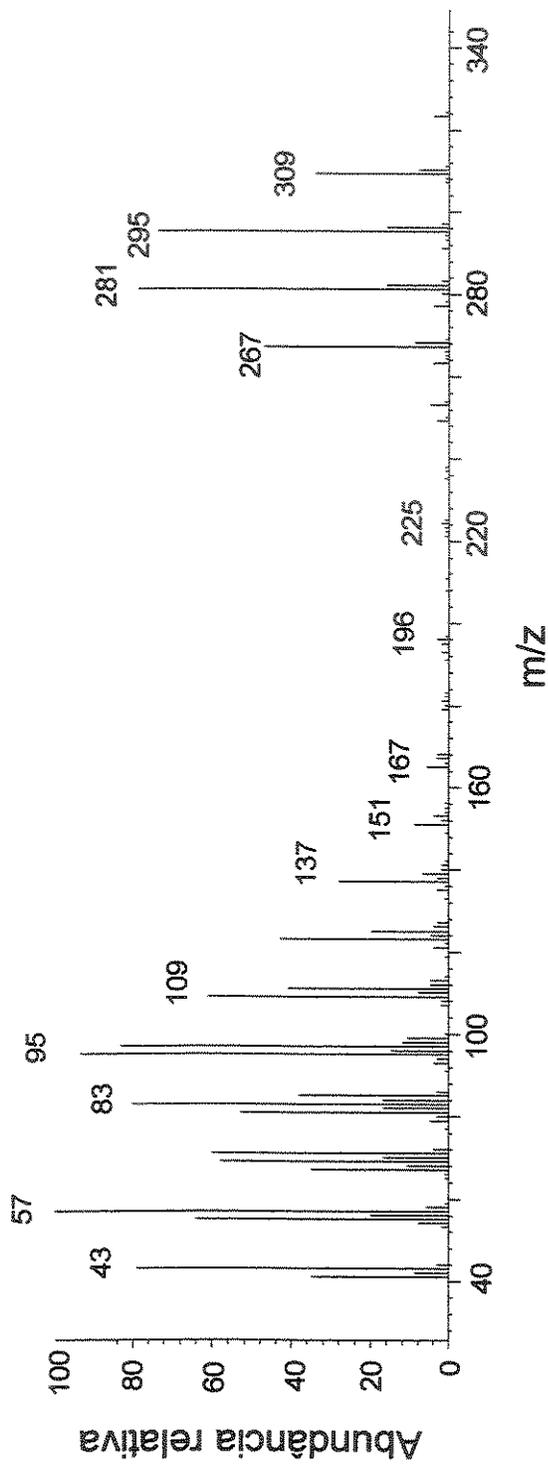


Figura 6.3. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 6 Tabela 3.5 e Figura 3.8.



156 Figura 6.4. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 14 Tabela 3.5 e Figura 3.8.

6.3. APÊNDICE III

ESPECTROS DE MASSAS DE SUBSTÂNCIAS NÃO IDENTIFICADAS EM *EPITYCHES EUPOMPE* E *AURELIANA FASCICULATA*

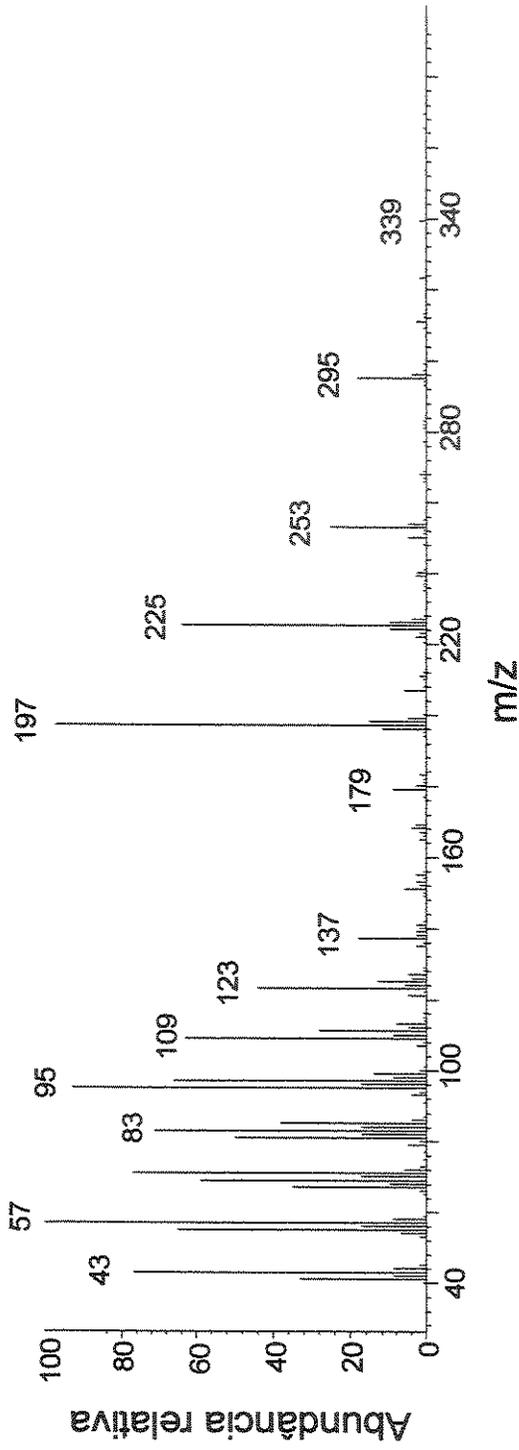
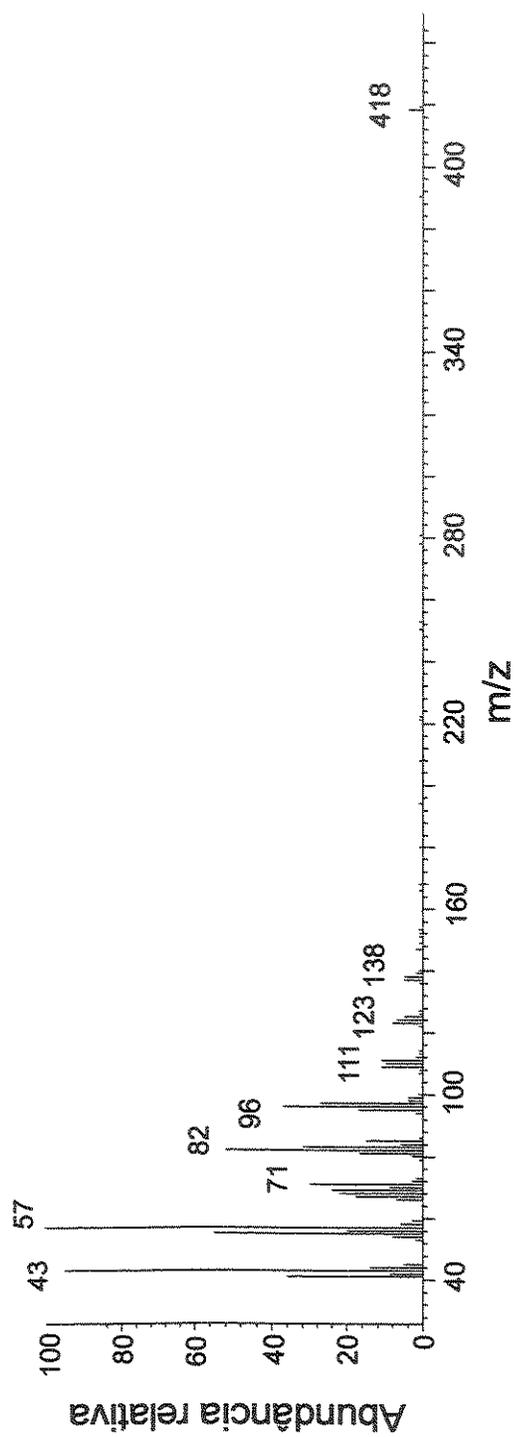


Figura 6.5. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância da substância 6 Tabela 3.6 e Figura 3.9. O mesmo padrão de fragmentação corresponde às substâncias 7, 9, 13, 14, 16, 17, 19, 21, 22 e 24 a 30 Tabela 3.6 e Figura 3.9.



158 Figura 6.6. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 11 Tabela 3.6 e Figura 3.9. O mesmo padrão de fragmentação corresponde à substância 20 Tabela 3.6 e Figura 3.9.

6.4. APÊNDICE IV

ESPECTROS DE MASSAS DE SUBSTÂNCIAS NÃO IDENTIFICADAS EM *PLACIDULA EURYANASSA* E *BRUGMANSIA SUAVEOLENS*

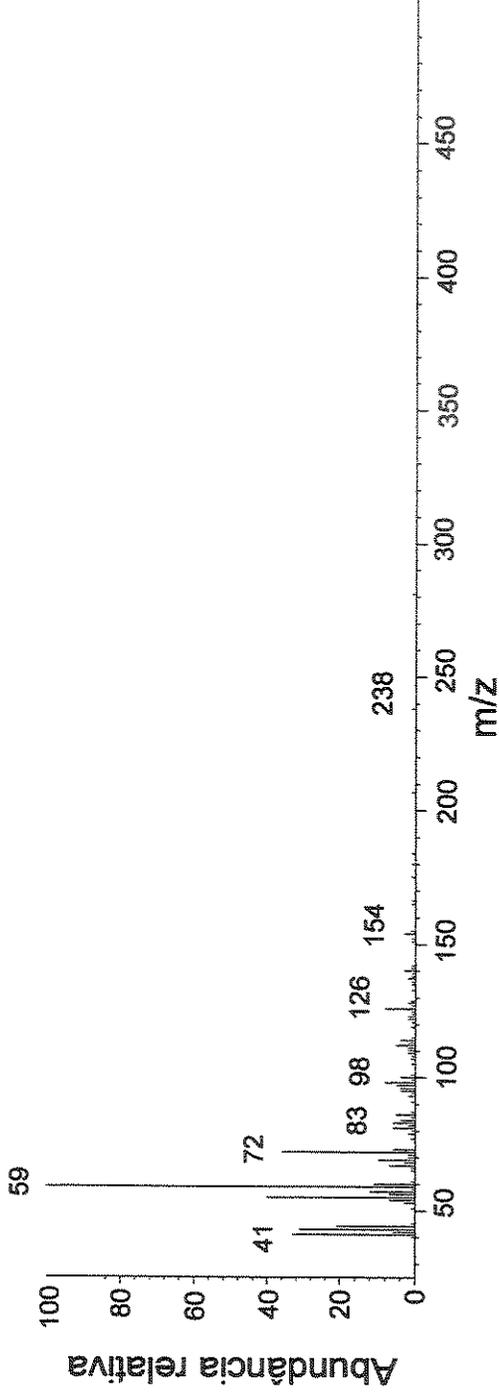


Figura 6.7. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 1 Tabela 3.7 e Figura 3.10.

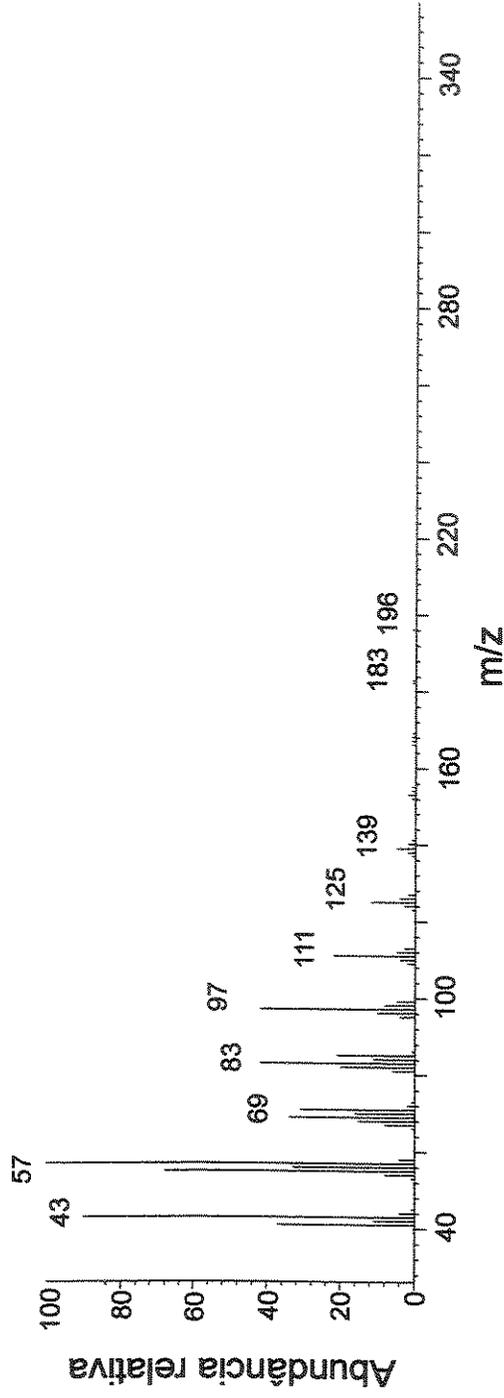


Figura 6.8. Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 4 Tabela 3.7 e Figura 3.10. O mesmo padrão de fragmentação corresponde às substâncias 5, 6, 8, 9 e 12 Tabela 3.7 e Figura 3.10.

O padrão de fragmentação das substâncias 17, 19, 24 e 26 corresponde ao padrão da substância 22 mostrada na

Figura 3.6.

6.5. APÊNDICE V

ESPECTROS DE MASSAS DE SUBSTÂNCIAS NÃO IDENTIFICADAS EM *MECHANITIS POLYMNIA* E *SOLANUM PANICULATUM*

- O padrão de fragmentação das substância 1 corresponde ao padrão da substância 11 de *Aureliana fasciculata* mostrada na Figura 6.6.
- O padrão de fragmentação das substâncias 2 e 4 corresponde ao padrão da substância 4 de *Brugmansia suaveolens* mostrada na Figura 6.8.
- O padrão de fragmentação das substâncias 8 e 13 corresponde ao padrão da substância 22 de *Placidula euryanassa* mostrada na Figura 3.6.

