

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Kamila Ferreira Massuda Garcia

**MECANISMOS DE DEFESA CONTRA PREDADORES EM LARVAS DA
BORBOLETA *Methona themisto* (NYMPHALIDAE: ITHOMIINAE)**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Kamila Ferreira Massuda Garcia
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre
em Ecologia

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Trigo

Campinas, 2008

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

G165m

Garcia, Kamila Ferreira Massuda

Mecanismos de defesa contra predadores em larvas da borboleta *Methona themisto* (Nymphalidae: Ithomiinae) / Kamila Ferreira Massuda Garcia. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: José Roberto Trigo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Methona themisto*. 2. *Brunfelsia uniflora*. 3. Defesa química. 4. Coloração de advertência (Biologia). 5. Aposematismo. I. Trigo, José Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Anti-predator defense mechanisms in larvae of the butterfly *Methona themisto* (Nymphalidae: Ithomiinae).

Palavras-chave em inglês: *Methona themisto*; *Brunfelsia uniflora*; Chemical defense; Warning coloration (Biology); Aposematism.

Área de concentração: Ecologia.

Titulação: Mestre em Ecologia.

Banca examinadora: José Roberto Trigo, Karina Lucas da Silva-Brandão, Paulo César Motta.

Data da defesa: 21/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Ecologia.

Campinas, 21 de fevereiro de 2008

Banca Examinadora:

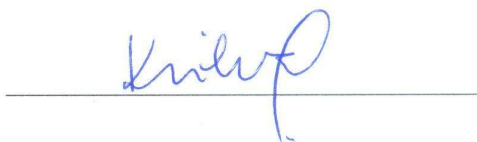
Prof. Dr. José Roberto Trigo (orientador)



Prof. Dr. Paulo César Motta



Prof^a. Dra. Karina Lucas da Silva-Brandão



Prof. Dr. Alberto José Arab Olavarrieta



Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas



“Há os que observam a realidade como ela é e se perguntam “porquê?” e há os que imaginam a realidade como nunca foi e se perguntam “porque não?””

(George Bernard Shaw)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para realização desse trabalho:

Agradeço, principalmente, ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Trigo, por sua confiança, amizade e ensinamentos;

Aos membros da pré-banca e banca, Prof. Dr. André V. L. Freitas, Prof^a. Dra. Flávia Nogueira de Sá, Prof. Dr. Paulo César Motta e Prof^a. Dra. Karina Lucas da Silva-Brandão pelas sugestões que colaboraram imensamente com essa dissertação;

Aos meus pais, Eiji e Ieda, por todo seu amor, fundamental em todos os momentos;

À minha irmã, Yula, pelo apoio, amizade e carinho;

Aos meus sogros, Osmil e Malu, minha nova família, por TUDO;

Aos meus amores, Emílio e Helena, por todos os finais de semana e feriados sacrificados pela mamãe, pela compreensão, paciência e ajuda;

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Química, Marcela Perreira, Mariana Stanton, Alberto Arab, Carlos Zanini, Marcelo Ribeiro dos Santos, Ricardo Terto e José Carlos da Silva, pelas discussões, ajuda de campo e laboratório e, principalmente, pela amizade;

Ao Prof. Dr. André V. L. Freitas, pelos conselhos e ajuda;

Aos responsáveis pelo Condomínio Colinas do Atibaia, que administram as visitas a Mata Ribeirão-Cachoeira, pela permissão concedida;

Ao IBAMA pela licença concedida;

E à FMB, pela concessão da bolsa.

ÍNDICE	Página
ABSTRACT	1
RESUMO	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1. Organismos estudados	10
3.1.1. <i>Methona themisto</i>	10
3.1.2. <i>Brunfelsia uniflora</i>	11
3.2. Sobrevivência de larvas. Influência de predadores	11
3.2.1. Sobrevivência das larvas de <i>Methona themisto</i> em mata secundária <i>versus</i> ambiente urbano	12
3.2.2. Análise estatística	13
3.3. Bioensaios com larvas vivas de <i>Methona themisto</i>	14
3.3.1. Bioensaio com <i>Camponotus crassus</i>	14
3.3.2. Bioensaio com <i>Lycosa erythrognatha</i>	15
3.3.3. Bioensaio com <i>Oxyopsis saussurei</i>	16
3.3.4. Bioensaio com <i>Gallus gallus</i>	16
3.3.5. Bioensaio com <i>Tropidurus itambere</i>	17
3.3.6. Análise estatística dos bioensaios com larvas vivas	18
3.4. Bioensaios com extratos das plantas e larvas vivas	19
3.4.1. Obtenção dos extratos orgânicos e aquosos (larvas de <i>Methona themisto</i> e folhas de <i>Brunfelsia uniflora</i>)	19
3.4.2. Obtenção do extrato alcaloidal de larvas de <i>Methona themisto</i>	20
3.4.3. Bioensaios no campo	20
3.4.4. Bioensaio com <i>Gallus gallus</i>	21
3.4.5. Análise estatística dos bioensaios com extratos da planta hospedeira e larvas de <i>Methona themisto</i>	21
3.5. Bioensaio de aprendizagem com <i>Gallus gallus</i>	21
3.5.1. Análise estatística do bioensaio de aprendizagem com <i>Gallus gallus</i>	22

4. RESULTADOS	23
4.1. Sobrevivência de larvas. Influência de predadores	23
4.1.1. Sobrevivência das larvas de <i>Methona themisto</i> em mata secundária versus ambiente urbano	23
4.2. Bioensaios com larvas vivas de <i>Methona themisto</i>	24
4.2.1. Bioensaio com <i>Camponotus crassus</i>	24
4.2.2. Bioensaio com <i>Lycosa erythrognatha</i>	24
4.2.3. Bioensaio com <i>Oxyopsis saussurei</i>	25
4.2.4. Bioensaio com <i>Gallus gallus</i>	25
4.2.5. Bioensaio com <i>Tropidurus itambere</i>	26
4.3. Bioensaios com extratos das plantas e larvas vivas	27
4.3.1. Bioensaios no campo	27
4.3.2. Bioensaio com <i>Gallus gallus</i>	27
4.4. Bioensaio de aprendizagem com <i>Gallus gallus</i>	27
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1. Estágios larvais de <i>Methona themisto</i> . A. ovo; B. larva de 1º instar; C. larva de 3º instar e D. larva de 5º instar	50
Figura 2. <i>Brunfelsia uniflora</i>	51
Figura 3. Compostos encontrados em <i>Brunfelsia uniflora</i> . A. Brunfelsamidina; B. Escopoletina e C. Calisteginas	52
Figura 4. Acompanhamento da sobrevivência de <i>Methona themisto</i> em plantas protegidas e desprotegidas de predadores	53
Figura 5. Curva de sobrevivência de <i>Methona themisto</i> em plantas protegidas contra predadores, em mata secundária e ambiente urbano	54
Figura 6. Curva de sobrevivência de <i>Methona themisto</i> em plantas desprotegidas contra predadores, em mata secundária e ambiente urbano	55
Figura 7. Curva de sobrevivência de <i>Methona themisto</i> em mata secundária	56
Figura 8. Curva de sobrevivência de <i>Methona themisto</i> em ambiente urbano	57
Figura 9. Acompanhamento da sobrevivência de <i>Methona themisto</i> A. Pupa predada por formigas. Bioensaios de predação com larvas de <i>Methona themisto</i> vivas B. <i>Camponotus crassus</i> ; C. <i>Lycosa erythrognatha</i> ; D. <i>Oxyopsis saussurei</i> ; E. <i>Gallus gallus</i> ; F. <i>Tropidurus itambere</i>	58
Figura 10. Tempo de manipulação e porcentagem de predação das larvas de <i>Methona themisto</i> por <i>Oxyopsis. saussurei</i> em dois dias não consecutivos	59
Figura 11. Comportamento de <i>Gallus gallus</i> em relação a diferentes instares larvais de <i>Methona themisto</i>	60
Figura 12. Bioensaio em campo com extratos aplicados em larvas palatáveis de <i>Tenebrio molitor</i> . A. Larvas presas às folhas e B. Larva predada	61
Figura 13. Predação por <i>Gallus gallus</i> em larvas de <i>Tenebrio molitor</i> tratadas com extratos de <i>Methona themisto</i>	62

Figura 14. Predação por <i>Gallus gallus</i> em larvas de <i>Tenebrio molitor</i> tratadas com extratos de <i>Methona themisto</i> . Bioensaios com extratos provenientes da extração de alcalóides	63
Figura 15. Comportamento de <i>Gallus gallus</i> em relação ao 3º instar larval de <i>Methona themisto</i> , as quais foram apresentadas em dias seqüenciais	64
Figura 16. Comportamento de <i>Gallus gallus</i> em relação ao 5º instar larval de <i>Methona themisto</i> , as quais foram apresentadas em dias seqüenciais	65
Figura 17. Larvas de <i>Tenebrio molitor</i> : sem pintura, pintada de marrom (críptica) e pintada no padrão de cores das larvas de <i>Methona themisto</i>	66
Figura 18. Comportamento de <i>Gallus gallus</i> que rejeitaram anteriormente larvas de <i>Methona themisto</i> , em relação a larvas <i>Tenebrio molitor</i> pintadas com diferentes padrões de cores	67

ABSTRACT

Chemical defense in Lepidoptera involves several mechanisms such as sequestration of secondary metabolism compounds of host plants and *de novo* synthesis of compounds that can provide some unpalatability or toxicity. The larvae of the butterfly *Methona themisto* (Nymphalidae: Ithomiinae) have a conspicuous coloration and feed exclusively on *Brunfelsia uniflora* (Solanaceae), that is rich in compounds of the secondary metabolism. These larvae were analyzed under several aspects to confirm if they are chemically defended.

Survivorship data showed predation significantly affecting larval survival in natural habitat. Larvae chemical defenses are inefficient against invertebrate predators, such as the spider *Lycosa erythrogna* and the ant *Camponotus crassus* (100% of predation), but it seems to be efficient against the mantid *Oxyopsis saussurei* (reduction of prey manipulation time and predation in a second contact). To vertebrate predators, like the lizard *Tropidurus itambere* and the chick *Gallus gallus*, defense acts through conspicuous coloration and palatability. Predation by *Gallus gallus* was highest upon 1st instar larvae, suggesting an increase of unpalatability throughout development. Learning avoidance tests with *Gallus gallus* demonstrated that few contacts with distasteful and warning colored prey could make the predator reject visually *Methona themisto* larvae. Chicks visually rejected palatable larvae painted in the same color pattern of *Methona themisto* larvae confirming their ability to associate taste and color. Only dichloromethanic extracts tested with chicks showed significant rejection in relation to controls. These results confirm that *Methona themisto* larvae are chemical defended against visually oriented vertebrate predators.

24

RESUMO

25

26

27

28

29

30

As defesas químicas em lepidópteros compreendem mecanismos que vão desde o seqüestro de compostos do metabolismo secundário de plantas até a biossíntese *de novo* de compostos que podem torná-los tóxicos ou impalatáveis. As larvas da borboleta *Methona themisto* (Nymphalidae: Ithomiinae), que apresentam coloração conspícua e se alimentam apenas da solanácea *Brunfelsia uniflora*, rica em compostos do metabolismo secundário, foram analisadas sob vários aspectos, para verificar se são quimicamente defendidas.

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

O acompanhamento da sobrevivência das larvas indicou que a predação afeta significativamente a sobrevivência em seu ambiente natural. As defesas químicas dessas larvas são aparentemente ineficazes contra predadores invertebrados, como a aranha *Lycosa erythrogna* e a formiga *Camponotus crassus* (100% dos indivíduos testados predaram as larvas), mas parecem ser eficazes contra os mantídeos *Oxyopsis saussuurei* (redução no tempo de manipulação da presa e predação em um segundo contato). Para predadores vertebrados como o lagarto *Tropidurus itambere* e a ave *Gallus gallus*, a defesa parece atuar em relação à palatabilidade e à coloração conspícua. *Gallus gallus* apresentou maior predação de larvas de 1º ínstar, sugerindo que há um incremento na impalatabilidade da larva no decorrer de seu desenvolvimento. Os testes de aprendizagem dos pintinhos demonstraram que com poucos contatos com a presa impalatável já se obtém uma resposta de rejeição visual. O emprego de uma larva de coloração semelhante a da *Methona themisto* indica que os pintinhos são capazes de relacionar a cor com o gosto desagradável, rejeitando assim uma presa palatável. Apenas extratos diclorometânicos das larvas testados com *Gallus gallus* foram significativamente rejeitados em relação a seus controles. Dessa forma, esses dados comprovam que as defesas químicas das larvas de *Methona themisto* atuam principalmente contra predadores vertebrados visualmente orientados.

48 1. INTRODUÇÃO

49 Dentre os insetos fitófagos, as borboletas surpreendem por apresentarem uma
50 incrível quantidade de adaptações morfológicas, comportamentais e químicas para evitar
51 seus inimigos naturais, principalmente os predadores (Ehrlich, 1984; Dempster, 1984). As
52 larvas dos lepidópteros desenvolveram diversas dessas táticas defensivas (Salazar &
53 Whitman, 2001). As adaptações morfológicas incluem a camuflagem, onde as larvas
54 podem simplesmente apresentar um padrão de cores semelhante ao seu hábitat (Clarke et
55 al., 1963) ou imitar formas não comestíveis como galhos (como na família Geometridae)
56 (Ruiter, 1952) e excremento (como no gênero *Papilio*) (Klots, 1951); a presença de uma
57 cutícula espessa e resistente como de *Papilio machaon* (Järvi et al., 1981); o uso de cera
58 cuticular abundante (Jones et al., 1982) ou a presença de espinhos como em *Euphydryas*
59 *phaeton* (Stamp, 1982). Algumas larvas, como as das famílias Lycaenidae e Riodinidae,
60 podem se associar a formigas oferecendo secreções nutritivas em troca de defesa
61 (Hölldobler & Wilson, 1990; DeVries 1991). As adaptações comportamentais
62 compreendem a fabricação de abrigos (Feichtinger & Reavey, 1989), o comportamento
63 minador (Harcourt, 1966), os atos de morder (Stamp, 1984) ou bater no predador, (Hopper,
64 1986), o comportamento de esconder as folhas danificadas pela alimentação (Heinrich &
65 Collins, 1983), a tanatose (Rawlins, 1984) e empupar fora da planta hospedeira (West e
66 Hazel, 1979).

67 As defesas químicas, em especial, envolvem uma variedade de mecanismos e
68 substâncias (Harborne, 1997). Estas podem ser sintetizadas pelo animal ou seqüestradas –
69 isto é, obtidas a partir de fontes alimentares tornando-os tóxicos ou impalatáveis (Trigo,
70 2000; Nishida, 2002). Larvas e adultos da família Zygaenidae, por exemplo, sintetizam
71 cianoglicosídeos, utilizados na fabricação de cianeto (Nahrstedt & Davis, 1983), o qual é

72 liberado em todos os estágios de desenvolvimento, incluindo ovos (Jones et al., 1962).
73 Larvas de *Heliconius* e *Acraea* da família Nymphalidae também sintetizam
74 cianoglicosídeos (Nahrstedt & Davis, 1981).

75 Assim, diversas características foram necessárias para a evolução do seqüestro de
76 compostos do metabolismo secundário das plantas por insetos fitófagos (Bowers, 1992).
77 Muitos insetos que se alimentam em plantas com compostos defensivos não os seqüestram
78 (Blum, 1983; Nishio, 1983, Bowers & Puttick, 1986), podendo eliminá-los relativamente
79 intactos (Blum, 1983) ou metabolizá-los (Gardner & Stermitz, 1988). Os compostos
80 seqüestrados são imunes ao ataque de enzimas detoxificantes do intestino larval (Brattsten,
81 1986) e passam através da parede intestinal até a hemolinfa com auxílio de moléculas
82 carregadoras (Wink & Schneider, 1988) ou são passivamente transportados (Lindigkeit et
83 al., 1997). Os tecidos dos animais impalatáveis podem ser imunes ou protegidos dos
84 efeitos tóxicos dos compostos seqüestrados (Bowers, 1993), ou podem ser afetados de
85 diversas maneiras naqueles não adaptados (Berenbaum, 1986).

86 Os compostos tóxicos seqüestrados pelos lepidópteros incluem as cardenolidas
87 (glicosídeos cardiotóxicos), que são seqüestrados por borboletas Danainae e mariposas
88 Arctiidae, Ctenuchidae; diterpenos graianóides por Geometridae; glicosídeos iridióides por
89 Nymphalinae, Geometridae e Sphingidae, alcalóides pirrolizidínicos por Ithomiinae,
90 Danainae e Arctiidae; alcalóides tropânicos por Ithomiinae, Lymantriidae e Sphingidae,
91 alcalóides quinolizidínicos por Pyralidae; alcalóides β -carbonílicos por Heliconiinae;
92 ácidos aristolóquicos por Papilionidae; glicosídeos cianogênicos por Heliconiinae, Acraeini
93 e Zygaenidae e glicosinolatos por Pieridae (Brown, 1984; Dyer, 1995; Trigo et al., 1996;
94 Eisner et al., 2000; Trigo, 2000; Nishida, 2002; Silva & Trigo, 2002).

95 A impalatabilidade nas larvas de lepidópteros pode ocorrer também devido a
96 presença de pêlos urticantes (Root, 1966; Bellows et al., 1982), toxinas elaboradas em
97 glândulas exócrinas especiais (Chow & Tsai, 1989; Weller, 1987), regurgito (Eisner et al.,
98 1974; Nishio, 1983) ou pela simples presença de compostos tóxicos da planta hospedeira
99 no intestino (Brower, 1984; Janzen, 1984). Um conjunto de outras características dos
100 lepidópteros pode se associar à impalatabilidade, como a coloração conspícua, o
101 comportamento gregário, o voo lento e as exhibições de alerta (Bates, 1862; Cott, 1940;
102 Brower, 1984). Sillén-Tulberg (1988), através de uma análise filogenética baseada em
103 caracteres morfológicos e mapeando a presença de coloração de advertência (como
104 indicador da impalatabilidade) e gregarismo em cada táxon, apontou que a impalatabilidade
105 surgiu antes do comportamento gregário nas larvas de lepidópteros e poderia ser explicada
106 através de seleção individual, ao invés da seleção parental, como proposto anteriormente
107 por Fisher (1930). Ela atribuiu isso a três características comportamentais do predador:
108 relutância inicial em atacar formas com coloração de alerta, rápido aprendizado para evitar
109 formas aposemáticas e menor dano a presa aposemática (Sillén-Tulberg, 1985). As
110 características associadas à impalatabilidade auxiliam no reconhecimento e no aprendizado
111 dos predadores para evitarem presas impalatáveis (Gittleman & Harvey, 1980; Gittleman et
112 al., 1980; Roper & Wistow, 1986). A coloração de alerta pode aumentar a sobrevivência de
113 um indivíduo, devido também a alguns predadores como pássaros, por exemplo, serem
114 mais resistentes em atacar presas muito coloridas ou desconhecidas (Coppinger, 1970;
115 Smith, 1975; Schuler & Hesse, 1985). Bates (1862) relacionou a impalatabilidade à
116 resistência dos corpos, considerando que essa característica permitiria à presa sobreviver
117 aos ataques dos predadores. Essa hipótese foi posteriormente confirmada através de
118 experimentos com diversos grupos de insetos impalatáveis (Boyden, 1976; Järvi et al.,
119 1981; Wiklund & Järvi, 1982). Além disso, foi demonstrado que a coloração conspícua

120 reduz a chance de um predador experiente fazer um ataque inapropriado, pois essas presas
121 podem ser detectadas a longa distância, aumentando o tempo de reconhecimento da presa
122 (Guilford, 1986). Roper e Redstone (1987) observaram que a conspicuidade afeta não só a
123 intensidade do aprendizado inicial em aves como também o tempo de duração em sua
124 memória. A vantagem seletiva do mimetismo Mülleriano (Müller, 1879) também foi
125 comprovada. Em experimentos utilizando pássaros tiranídeos na Floresta Amazônica,
126 observou-se que a proteção conferida pelo mimetismo foi restrita aos locais onde tanto os
127 predadores quanto os mímicos co-ocorriam (Pinheiro, 2003). Cardoso (1997) demonstrou
128 ainda associação a um padrão de cores específico (listras azuis) à impalatabilidade da
129 monocrotalina, um alcalóide pirrolizidínico, frente ao tico-tico rei cinza (*Coryphospingus*
130 *pileatus*), utilizando larvas de *Tenebrio molitor*. O comportamento gregário também é
131 vantajoso quando associado à impalatabilidade e à coloração aposemática, pois aumenta a
132 magnitude do sinal, potencializando a eficácia da defesa química (Cott, 1940; Edmunds,
133 1974; Guilford, 1990). Contudo, existem exceções a essas associações, como insetos
134 crípticos impalatáveis (Järvi et al., 1981), larvas impalatáveis solitárias (Danainae) (Vane-
135 Wright & Ackery, 1986) e miméticos conspícuos palatáveis (Bates, 1862).

136 Nas borboletas, as defesas químicas podem atuar em todos os estágios da história de
137 vida, dadas as fortes pressões de predação as quais estão submetidas. Ovos e larvas jovens,
138 por exemplo, são mais suscetíveis ao ataque de artrópodes, principalmente ácaros, aranhas,
139 vespas, formigas, percevejos e besouros, enquanto os últimos ínstaes e as pupas são mais
140 atacados por vertebrados, incluindo lagartos, aves, ratos e primatas (Brower, 1984 e
141 referências nele citadas). Dentro da família Nymphalidae, a subfamília Ithomiinae possui
142 espécies que serviram de modelos impalatáveis no desenvolvimento da teoria do
143 mimetismo (Bates, 1862; Müller, 1879), sendo normalmente rejeitadas por predadores

144 vertebrados (Brower, 1984) ou invertebrados (Brown, 1984). Contudo, apesar de seus
145 sistemas de defesas químicas terem sido descritos há pouco mais de duas décadas (Brown,
146 1984, 1985, 1987), muitas questões ainda permanecem sem respostas. A princípio, pensou-
147 se que as solanáceas seriam a fonte da proteção química desses ithomíneos (Brower &
148 Brower, 1964; Young, 1972; Drummond, 1976, 1981; Brown, 1980). Entretanto, relatos de
149 adultos capturados na natureza contendo alcalóides pirrolizidínicos ou visitando flores que
150 contêm esses compostos (Pliske, 1975) sugeriram que tais compostos pudessem ser um
151 meio complementar de defesa química (Edgar & Culvenor, 1974, Boppré, 1978; Edgar et
152 al., 1979; Edgar 1982). Finalmente, os experimentos de Brown (1984, 1985, 1987)
153 mostraram que apenas adultos capturados na natureza continham alcalóides pirrolizidínicos
154 e eram evitados por aranhas da espécie *Nephila clavipes* (Araneae: Nephilidae), enquanto
155 os extratos de folhas de solanáceas não continham tais compostos. A partir disso, algumas
156 hipóteses tentam explicar a evolução dos alcalóides pirrolizidínicos nos ithomíneos e seu
157 papel na defesa desse grupo de borboletas (Boppré, 1978; Edgar, 1975; Edgar, 1984; Edgar
158 et al., 1974; Trigo & Motta, 1990). Em uma revisão recente sobre a ecologia química dos
159 ithomíneos, Trigo (2008) discute essas hipóteses. Uma delas considera que os ancestrais
160 dos Nymphalidae, Ithomiinae e Danainae, alimentavam-se de plantas que continham tanto
161 cardenolidas como alcalóides pirrolizidínicos, que lhes conferiam proteção química e
162 comunicação química sexual. Fortes pressões de herbivoria teriam possibilitado uma
163 divisão das plantas hospedeiras ancestrais desses grupos (plantas com cardenolidas, plantas
164 com alcalóides pirrolizidínicos e outras que não produziam nenhum desses dois
165 compostos). A partir disso, os três grupos de plantas teriam herbívoros hospedeiros
166 específicos adaptados aos seus respectivos compostos tóxicos e no caso da maioria dos
167 ithomíneos, especializados em solanáceas (as quais não possuem cardenolidas ou
168 alcalóides pirrolizidínicos). Os adultos teriam que suprir sua carência por alcalóides

169 pirrolizidínicos, alimentando-se do néctar que plantas que os possuísem (Edgar, 1975;
170 Edgar, 1984; Edgar et al., 1974; Trigo & Motta, 1990). A outra hipótese coloca que essa
171 adaptação dos ithomíneos aos alcalóides pirrolizidínicos não deve ser dependente da planta
172 hospedeira da larva. Ela considera que os ancestrais adultos desses dois grupos
173 alimentavam-se em várias espécies de plantas e ao longo do tempo, aqueles que toleraram o
174 néctar tóxico com alcalóides pirrolizidínicos sobressaíam-se em relação a outras espécies e
175 acabaram por ser selecionadas em função da proteção dada por esses compostos contra
176 predadores. As características aposemáticas, que surgissem a seguir, seriam mantidas com
177 a evolução do mimetismo Mülleriano. As borboletas que depois puderam utilizar os
178 alcalóides pirrolizidínicos ou cardenolidas das plantas hospedeiras de suas larvas teriam
179 uma proteção adicional para este estágio (Boppré, 1978).

180 Dessa forma, devido à falta de informações sobre as defesas químicas dos imaturos
181 das diversas espécies ithomiíneas, principalmente aquelas que utilizam exclusivamente
182 solanáceas como planta hospedeira, as larvas da espécie *Methona themisto* (Nymphalidae:
183 Ithomiinae) apresentaram-se como um bom objeto de estudo, por utilizarem a *Brunfelsia*
184 *uniflora* (Solanaceae: Salpiglossideae) como planta hospedeira e apresentarem uma
185 característica típica de inseto impalatável, a coloração conspícua. Além disso, essa espécie
186 é facilmente encontrada em áreas urbanas do Sul e Sudeste brasileiro, sendo extremamente
187 resistente às perturbações humanas.

188

189 2. OBJETIVOS

190 O objetivo desse projeto foi investigar se larvas da borboleta *Methona themisto*
191 (Nymphalidae: Ithomiinae) as quais apresentam coloração conspícua (Figura 1), são
192 defendidas quimicamente contra predadores. Para tanto, os seguintes objetivos específicos
193 foram desenvolvidos:

194 1) Determinar a sobrevivência das larvas de *Methona themisto* no campo, com a
195 finalidade de verificar se predação seria um fator de mortalidade importante nesse
196 estágio de desenvolvimento e observando assim, a eficácia de uma provável defesa
197 química;

198 2) Determinar se as larvas vivas de *Methona themisto* são defendidas contra
199 predadores modelos:

200 a. Invertebrados *Camponotus crassus* (Hymenoptera: Formicidae), *Lycosa*
201 *erythrognatha* (Araneae: Lycosidae) e *Oxyopsis saussurei* (Mantidae:
202 Stagmatopterinae);

203 b. Vertebrados *Gallus gallus* (Galliformes: Phasianidae) e *Tropidurus itambere*
204 (Sauria: Tropiduridae);

205 3) Verificar a aceitação dos extratos químicos das larvas e da planta hospedeira por
206 predadores no campo e em laboratório, para determinar se há proteção química;

207 4) Avaliar a influência da coloração conspícua de *Methona themisto* na aprendizagem
208 de predadores, através de testes com larvas vivas de *Methona themisto* e larvas
209 palatáveis pintadas no padrão de cores de *Methona themisto*;

210

211 3. MATERIAIS E MÉTODOS

212 3.1. ORGANISMOS ESTUDADOS

213 3.1.1. *Methona themisto*

214 A borboleta *Methona themisto* (Hübner, 1818), como a maioria dos Ithomiinae,
215 utiliza uma solanácea (*Brunfelsia uniflora*) como planta hospedeira de suas larvas (Lamas,
216 1973). O gênero *Methona* subdivide-se em 7 espécies e apenas a subespécie *Methona*
217 *themisto muelleri* ocorre no sudeste do Brasil (Lamas, 1973). Sua posição filogenética
218 ainda é confusa e novos trabalhos sugerem a mudança do gênero para uma tribo própria,
219 Methonini (Wilmott & Freitas, 2006). Estudos recentes demonstram uma grande
220 ocorrência dessa espécie em áreas urbanas (Ruszczyk & Nascimento, 1999).

221 De acordo com Lamas (1973), na desova de *Methona themisto* são postos ovos
222 solitários, geralmente na face abaxial das folhas. Os raros agrupamentos desordenados de
223 ovos são devido às várias visitas das fêmeas em uma mesma folha. Nunca se viu postura de
224 mais de um ovo por vez e cada postura dura em média 60 segundos. O ovo (Figura 1A)
225 não é resguardado e possui coloração branca brilhante, medindo até 1,5 mm de altura e 1
226 mm de largura. Em aproximadamente 6 ou 7 dias ocorre a eclosão da larva. As larvas de
227 1º ínstar medem aproximadamente 2 a 3 mm (Figura 1B), passando para 20 mm no 3º
228 ínstar (Figura 1C) e chegando a 42 mm no 5º e último ínstar (Figura 1D). As larvas dessa
229 borboleta têm comportamento solitário e coloração conspícua durante os últimos ínstar
230 (preta e laranja). A fase larval dura aproximadamente 20 dias, até as larvas cessarem sua
231 alimentação, permanecendo imóveis por 2 dias para a formação da crisálida. A crisálida é
232 suspensa e de cor amarela brilhante. Este estágio tem duração de 9 dias até a emergência
233 do adulto (Lamas, 1973).

3.1.2. *Brunfelsia uniflora*

Brunfelsia uniflora (Pohl) D. Don é um arbusto ramificado que pode atingir 3 metros de altura (Figura 2). Possui ramos nodosos e densos, com folhas ovaladas e verdes escuras. Suas flores aparecem solitárias na extremidade do ramo durante a primavera e o verão, mudando de cor ao longo do tempo. O gênero *Brunfelsia* é um grupo relativamente derivado dentro das solanáceas (Plowman, 1979). *Brunfelsia* compõe a tribo Salpiglossideae, mas uma análise filogenética baseada em DNA de cloroplastos sugeriu sua posição dentro de uma nova tribo, formada ainda pelos gêneros, *Petunia* e *Fabiana* de Nicotianeae (Olmstead & Palmer, 1992).

Cerca de 40 espécies de *Brunfelsia* foram descritas até o momento, mas apenas 19 ocorrem na América do Sul (Plowman, 1979). Algumas espécies como a *Brunfelsia uniflora*, conhecida como manacá de cheiro ou de jardim, possuem efeito terapêutico no tratamento da sífilis e reumatismo, assim como efeitos diurético, abortivo e purgativo (Schultes, 1976). No gênero *Brunfelsia* já foram identificados compostos químicos como brunfelsamidina (=1H-pirrol-3-carboximidamida) (Lloyd et al., 1985), escopoletina (Mors & Ribeiro, 1957) e calisteginas (Bekkouche et al., 2001) (Figura 3).

3.2. SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS. INFLUÊNCIA DE PREDADORES

Para verificar a influência da predação na sobrevivência das larvas de *Methona themisto*, as quais supostamente possuem defesas químicas, comparou-se a sobrevivência das larvas em plantas protegidas e desprotegidas de predadores em ambiente de mata secundária e em ambiente urbano, onde essa espécie ocorre.

255 **3.2.1. Sobrevivência de larvas de *Methona themisto* em mata secundária versus**
256 **ambiente urbano**

257 Larvas de *Methona themisto* foram coletadas em residências da cidade de Paulínia,
258 no próprio Departamento de Zoologia da Unicamp e em praças públicas da cidade de
259 Campinas e criadas em cativeiro, até a idade adulta, para obtenção dos ovos.

260 As larvas foram mantidas em frascos plásticos (5 cm de diâmetro e 8 cm de altura),
261 em câmaras com luminosidade e temperatura controladas (12h luz/12h escuro; 27°C) e
262 umidade relativa parcialmente controlada ($\pm$ 50-60%). As larvas foram alimentadas
263 diariamente com folhas frescas de *Brunfelsia uniflora* até que atingissem o estágio de pupa.
264 As pupas foram transferidas para gaiolas (feitas com madeira e tela de mosquito, de 30 x
265 30 x 45 cm), onde tiveram espaço suficiente para a abertura das asas dos adultos. Como
266 nessa espécie as larvas formam pupas suspensas, para transferência, após descolá-las do
267 local de adesão, estas foram coladas à ponta de uma linha, a qual foi fixada no alto da
268 gaiola. Assim que os adultos emergiram, foram transferidos para uma casa de vegetação,
269 onde podiam encontrar alimento (flores de *Penta lanceolata* ou solução a base de água e
270 mel 50%, oferecida em alimentadores para beija-flores) e a planta hospedeira para
271 oviposição. Dos ovos obtidos através dessa criação, apenas 20% não eclodiram.

272 Após a obtenção dos ovos, estes foram mantidos em câmaras de criação, nas
273 condições descritas acima, para obtenção de larvas de primeiro ínstar. A utilização de ovos
274 coletados em campo não foi possível, já que mais de 65% deles apresentavam-se
275 parasitados.

276 O experimento foi realizado em ambiente de mata secundária [Mata Ribeirão-
277 Cachoeira (22°50'S 46°55'W) localizada no Distrito de Sousas, município de Campinas,
278 SP] e em ambiente urbano [campus da Universidade Estadual de Campinas (22°49'S

279 47°05'W), próximo ao Departamento de Zoologia]. Em cada local foram utilizados 10
280 indivíduos de *Brunfelsia uniflora*, dispostos dois a dois (protegidos e desprotegidos de
281 predadores) (Figura 4). Nas plantas protegidas, foram utilizadas gaiolas de PVC, com 1 m³
282 de dimensão, fixadas no solo com auxílio de ganchos e cobertas com tela de mosquiteiro
283 (feitas de polietileno, 1 mm de abertura). Além disso, para evitar a visitação por formigas,
284 a base do caule das plantas foi recoberta por Tanglefoot™, uma resina que impede que elas
285 subam pelo caule. Nas plantas desprotegidas, uma placa contendo Tanglefoot™ foi posta
286 ao lado da planta, no caso dessa resina interferir na sobrevivência das larvas.

287 Larvas recém-emergidas dos ovos foram acondicionadas nas folhas das plantas, as
288 quais foram inspecionadas a cada dois dias, entre os meses de janeiro a abril de 2007. Em
289 cada planta foram colocadas aproximadamente 20 larvas. As observações foram realizadas
290 de acordo com Portugal (2001) e foram observados o número de larvas e as mudanças de
291 ínstar. Como as larvas empupam fora de sua planta hospedeira, mas próximas a elas, as
292 larvas de 5º ínstar foram retiradas da planta e deixadas para empupar individualmente em
293 laboratório. Assim, consideramos a sobrevivência das larvas somente até o final do 4º
294 ínstar, já que a sobrevivência das larvas de 5º ínstar foi superestimada. Para estimarmos a
295 sobrevivência das pupas em campo, estas foram devolvidas aos locais de experimento,
296 próximas a planta hospedeira e monitoradas até a emergência de adultos.

297 **3.2.2. Análise estatística**

298 As comparações das curvas de sobrevivência obtidas através dos acompanhamentos
299 das larvas em plantas protegidas e desprotegidas de predadores, em mata secundária e
300 ambiente urbano foram analisadas pelo teste Log-rank (Kleinbaum, 1996). Nessas
301 comparações múltiplas (cada uma com 1 gl) foi utilizada a correção de Bonferroni para que
302 se controlasse o erro do tipo I (Rice, 1989). Essa correção é dada por $\alpha/\text{número de}$

comparações. Nesse caso, foram realizadas 4 comparações: 1) plantas protegidas da mata secundária *versus* plantas protegidas em ambiente urbano; 2) plantas desprotegidas da mata secundária *versus* plantas desprotegidas em ambiente urbano; 3) plantas protegidas da mata secundária *versus* plantas desprotegidas da mata secundária e 4) plantas protegidas de ambiente urbano *versus* plantas desprotegidas em ambiente urbano. Assim, o valor de p-crítico será igual ao α utilizado (0,05) dividido pelo número de comparações realizadas (4), p-crítico igual a 0,0125.

3.3. BIOENSAIOS COM LARVAS VIVAS DE *METHONA THEMISTO*

3.3.1. Bioensaio com *Camponotus crassus*

Devido à predação por formigas representar uma das maiores causas de mortalidade de larvas de borboletas não mirmecófilas em suas plantas hospedeiras (Freitas & Oliveira, 1996), 10 colônias das formigas *Camponotus crassus* Mayr 1862 (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae) foram utilizadas para avaliação da palatabilidade das larvas de *Methona themisto*. Esta formiga neotropical é arborícola e constrói ninhos em troncos vivos ou mortos (Kusnezov, 1951), além de patrulhar as plantas hospedeiras de diversos itomiíneos ou guardar hemípteros quando estes estão presentes (Portugal, 2001). Além dessa espécie, outras duas espécies, *Camponotus rufipes* Fabricius 1775 (duas colônias) e *Camponotus rengerii* Emery 1894 (três colônias) foram testadas.

As colônias de formigas utilizadas nos testes foram coletadas na Estação Ecológica Experimental de Itirapina (22°15'S 47°51'W). Segundo a metodologia proposta por Portugal (2001), cada colônia foi tratada com uma larva palatável, *Tenebrio molitor* Linnaeus 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae), 48 horas antes do início do teste, a fim de padronizar o nível de alimentação entre as colônias. Larvas experimentais de *Methona*

326 *themisto* de 5º instar foram oferecidas às colônias em folhas de suas plantas hospedeiras e
327 colocadas em pequenos frascos de vidro com água, para se manterem túrgidas por 24 horas
328 (duração do experimento). Após as 48 horas da padronização alimentar, um organismo
329 teste foi oferecido e depois de 24 horas foi observado se houve ou não a predação da larva.
330 Para cada colônia testada foram realizados dois ensaios, com intervalo de uma semana entre
331 eles, para avaliar a reação deste modelo de predador em um segundo contato com a presa.

332 **3.3.2. Bioensaio com *Lycosa erythrognatha*.**

333 Este ensaio foi realizado como proposto por Gonzáles et al. (1999). Trinta
334 indivíduos de *Lycosa erythrognatha* Lucas 1836 (Arachnida: Araneae: Lycosidae),
335 conhecida como tarântula ou aranha-de-grama, foram coletados nos arredores do campus da
336 Unicamp e mantidos isoladamente em recipientes plásticos transparentes (15 x 12 cm,
337 diâmetro x altura). Durante as duas semanas que antecederam o teste, receberam apenas
338 água, em algodão embebido, e uma larva de *Tenebrio molitor*. Cada larva de *Methona*
339 *themisto* de 5º instar foi oferecida às aranhas transferindo-as com o auxílio de uma pinça
340 exatamente à frente das quelíceras. As larvas foram consideradas aceitas se aprisionadas
341 pelas aranhas e mortas por umas ou mais mordidas, e foram consideradas rejeitadas se
342 estivessem vivas ou intactas 24 horas após o ataque. A rejeição das larvas foi validada
343 apenas quando as aranhas aceitaram uma larva de *Tenebrio molitor* oferecida após o teste.
344 Para cada indivíduo testado foram realizados dois ensaios, com um intervalo de uma
345 semana entre eles, para avaliar a reação deste modelo de predador em um segundo contato
346 com a presa.

3.3.3. Bioensaio com *Oxyopsis saussurei*

Dez fêmeas do louva-a-deus *Oxyopsis saussurei* Giglio-Tos, 1914 (Mantodea: Mantidae: Stagmatopterinae) foram mantidas em gaiolas individuais, sob condições ambiente de temperatura e fotoperíodo. Os indivíduos foram alimentados a cada dois dias com larvas de *Tenebrio molitor* e moscas (*Musca domestica* Linnaeus 1758, Diptera: Muscidae) criadas em laboratório. Dois dias antes de cada teste, os indivíduos receberam uma larva de *Tenebrio molitor* para padronização alimentar. De acordo com Berenbaum e Miliczky (1984), registrou-se o tempo de manipulação da presa pelo predador em dois dias não consecutivos, para avaliar a reação do predador em um segundo contato com a presa. Além disso, verificou-se a porcentagem de predação das larvas, sendo consideradas rejeitadas aquelas liberadas após uma ou duas mordidas. Para validação do teste em caso de rejeição, esta resposta só seria considerada se o indivíduo aceitasse uma larva palatável de *Tenebrio molitor*.

3.3.4. Bioensaio com *Gallus gallus*

De acordo com Silva (2000), indivíduos machos de *Gallus gallus* Linnaeus 1758 (Galliformes: Phasianidae) adquiridos em lojas de animais foram mantidos em grupo, com alimentação a base de ração e água até atingirem uma semana de idade e sob condições ambientes de temperatura e fotoperíodo durante os meses quentes do ano ou aquecidos por aquecedores (temperatura aproximada 28 °C) durante os meses frios.

Após uma semana, os pintinhos tiveram seus pés numerados para identificação individual e por três dias cada indivíduo foi treinado a aceitar larvas de *Tenebrio molitor*. Nesse treinamento, as larvas vivas foram oferecidas após um período de 2 h de jejum e os indivíduos que não as aceitaram até o terceiro dia de treino não foram utilizados nos

370 experimentos. O treinamento teve o intuito de evitar que os predadores rejeitassem as
371 presas por não as reconhecerem como alimento.

372 O experimento consistiu no oferecimento de uma larva-controle (*Tenebrio molitor*)
373 seguido de uma larva experimental de 1º, 3º ou 5º ínstar de *Methona themisto*, para avaliar
374 se existem diferenças de rejeição entre os ínstaes. Foram utilizadas 30 larvas de cada
375 ínstar. Os pintinhos utilizados foram treinados com larvas de *Tenebrio molitor* de tamanho
376 correspondente aos das larvas de *Methona themisto* testadas.

377 A fim de confirmar a fome e a aptidão dos pintinhos para atacar suas presas, foi
378 oferecida uma nova larva-controle após o oferecimento da larva experimental. Assim como
379 em Silva (2000) a reação do predador em relação às larvas experimentais foi observada por
380 dois minutos e registrada como: 1. atacada e predada; 2. atacada e não ingerida; 3. não
381 atacada. O teste só teve validade caso o indivíduo ingerisse as duas larvas controles.
382 Todos os ensaios e treinamentos foram realizados no mesmo local de acondicionamento
383 dos pintinhos, já que aves criadas em laboratório são facilmente perturbadas. Além disso,
384 as larvas rejeitadas e que permaneceram vivas foram mantidas individualmente por três dias
385 ou até empuparem, para verificar se as mesmas sobreviveriam após contato com o
386 predador.

387 **3.3.5. Bioensaio com *Tropidurus itambere***

388 Quatro indivíduos adultos do lagarto *Tropidurus itambere* Rodrigues, 1987 (Sauria:
389 Tropiduridae) foram coletados em terrenos baldios da região urbana da cidade de Campinas
390 e mantidos em laboratório durante o período dos experimentos. Estes indivíduos foram
391 acondicionados em terrários de vidro de 0,30 x 1,0 m, contendo uma camada de areia e
392 folhiço. Foram alimentados com larvas de *Tenebrio molitor*, adultos da mariposa
393 *Spodoptera frugiperda* Smith 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) e eventualmente cupins das

394 espécies *Conitermes cumulans* Kollar 1832 (Isoptera: Termitidae) e *Coptotermes gestroi*
395 Wasmann 1896 (Isoptera: Rhinotermitidae).

396 Para realização do experimento, nas 24h que o antecederam, foram oferecidas 15
397 larvas de *Spodoptera frugiperda* para padronização alimentar dos indivíduos. Para o
398 experimento foi oferecida uma larva de *Methona themisto* de 5º ínstar e a reação do
399 predador em relação às larvas experimentais foi observada por dez minutos e registrada
400 seguindo o procedimento realizado para *Gallus gallus*. Todos os ensaios foram realizados
401 no mesmo local de acondicionamento dos animais.

402 **3.3.6. Análise estatística dos bioensaios com larvas vivas**

403 Para analisar se houve diferenças no tempo de manipulação das larvas de *Methona*
404 *themisto* pelos louva-a-deuses, nos dois dias de contato, utilizou-se um teste t-pareado (Zar,
405 1999). Para os experimentos com *Gallus gallus* foi feita uma comparação das porcentagens
406 de predação para os três diferentes ínstares de *Methona themisto*, através de um teste G de
407 contigência (Zar, 1999).

408 **3.4. BIOENSAIOS COM EXTRATOS DA PLANTA HOSPEDEIRA E DAS LARVAS DE METHONA** 409 **THEMISTO**

410 Para determinar se as larvas de *Methona themisto* são defendidas quimicamente,
411 foram realizados ensaios com extratos orgânicos e aquosos das larvas e da planta
412 hospedeira, em condições de campo e em laboratório, contra predadores vertebrados e
413 invertebrados. Devido a planta hospedeira dessas larvas possuir alcalóides em sua
414 composição (Lloyd et al. 1985; Bekkouche et al. 2001), extratos alcaloidais das larvas de
415 *Methona themisto* foram obtidos e testados contra indivíduos de *Gallus gallus*, com a

416 finalidade de verificar a presença desses compostos nas larvas e sua atividade biológica
417 contra esse predador.

418 **3.4.1. Obtenção dos extratos orgânicos e aquosos (larvas de *Methona themisto* e**
419 **folhas de *Brunfelsia uniflora*)**

420 Larvas de *Methona themisto* ou folhas frescas de *Brunfelsia uniflora* foram
421 extraídas 3 vezes em MeOH:H₂O 4:1 (10x volume/peso) triturando em um
422 homogeneizador, desintegrador e emulsificador tipo TURRAX (Marconi, Piracicaba, SP)
423 até completa homogeneização do material no solvente. Os homogeneizados foram filtrados
424 e reunidos. Em seguida, o filtrado foi reduzido em rotaevaporador de baixa pressão, à
425 40°C, até restar somente água como solvente. Esta fase aquosa foi lavada 3 vezes com
426 diclorometano, originando uma fase orgânica. A fase orgânica também foi lavada três
427 vezes com água e posteriormente reunida e tratada com Na₂SO₄ anidro, filtrada e
428 evaporada. Esse procedimento visa eliminar substâncias que apresentem uma afinidade
429 similar pela fase orgânica e pela aquosa. Após a lavagem, a fase aquosa foi liofilizada.

430 A fase aquosa foi ressuspensa em água destilada e a fase orgânica em
431 diclorometano. O peso seco médio das larvas de *Tenebrio molitor* (40 mg) foi utilizado
432 para calcular uma quantidade de extrato proporcional ao peso seco de *Methona themisto*.
433 No caso das folhas, uma quantidade de extrato proporcional a 0,1, 1,0 e 10,0 % do peso
434 seco da larva de *Tenebrio molitor* foi arbitrariamente determinada. O volume final de cada
435 extrato foi calculado de forma que se utilizasse 20 µl do extrato para cada unidade
436 experimental (cada larva de *Tenebrio molitor*). Nos experimentos, para o controle do
437 solvente do extrato orgânico, aplicou-se 20 µl de diclorometano e para o controle do
438 solvente do extrato aquoso, 20 µl de água.

3.4.2. Obtenção do extrato alcaloidal de larvas de *Methona themisto*

Larvas de *Methona themisto* foram extraídas 3 vezes em MeOH:H₂O 4:1 (5x volume/peso) e triturado como acima. Os homogeneizados foram filtrados e reunidos. O filtrado foi reduzido em rotaevaporador como acima até restar somente água como solvente. Este extrato aquoso foi acidificado com ácido clorídrico a 1N e lavado 3 vezes com diclorometano, originando uma fase orgânica neutra. A fase neutra foi tratada com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada. A fase aquosa, de onde se obtém os alcalóides, foi basificada com hidróxido de amônio e novamente lavada por três vezes com diclorometano:MeOH 3:1, tendo ainda uma última lavagem feita apenas com clorofórmio. Destas novas duas fases, descartou-se a fração aquosa e se evaporou o diclorometano da fração alcaloidal.

3.4.3. Bioensaios no campo

Para testar os efeitos desses extratos em predadores no campo, o material foi ressuspenso em solvente correspondente e aplicado em larvas de *Tenebrio molitor* liofilizadas. Utilizou-se o peso seco médio das larvas de *Tenebrio molitor* para aplicar uma quantidade de extrato proporcional ao peso seco de *Methona themisto* (em uma concentração equivalente a 5 larvas). A concentração de 5 equivalentes foi utilizada para maximizar a resposta aos extratos.

O trabalho em campo foi desenvolvido em ambiente de mata secundária e urbano, onde larvas liofilizadas de *Tenebrio molitor* divididas em: larvas teste (1. tratadas com extrato diclorometânico de larvas *Methona themisto*, 2. tratadas com extrato aquoso de larvas de *Methona themisto*, 3. tratadas com extrato diclorometânico da planta hospedeira e 4. tratadas com extrato aquoso da planta hospedeira) e larvas controle (tratadas com água ou com diclorometano e larvas de *Methona themisto*), foram coladas na face abaxial das

folhas (local no qual as larvas costumam ser encontradas) com cola Super Bonder[®]. Foram feitas inspeções diárias, sendo observado o número de larvas presentes e desaparecidas; larvas parcialmente comidas foram consideradas predadas.

3.4.4. Bioensaio com *Gallus gallus*

Os extratos foram aplicados nas larvas de *Tenebrio molitor* como descrito acima. Os indivíduos machos de *Gallus gallus* também foram mantidos como descrito acima.

O experimento consistiu no oferecimento de uma larva controle, tratada com água ou diclorometano, dependendo do solvente utilizado na extração; uma larva teste (larvas tratadas com: 1. extrato diclorometânico de larvas *Methona themisto*; 2. extrato aquoso de larvas de *Methona themisto*; 3. extrato diclorometânico da planta hospedeira; ou 4. extrato aquoso da planta hospedeira) e em seguida outra larva controle, sem tratamento algum. A concentração de extrato aplicada em cada larva foi equivalente a 1 e 5 larvas de *Methona themisto*. A reação do predador em relação às larvas experimentais foi observada por dois minutos e registrada como: 1. atacada e ingerida; 2. atacada e não ingerida; 3. não atacada. O teste só teve validade caso o indivíduo ingerisse as larvas controles.

3.4.5. Análise estatística dos bioensaios com extratos da planta hospedeira e larvas de *Methona themisto*

Para a análise dos bioensaios com *Gallus gallus* foram comparadas as percentagens de predação entre os tratamentos através do teste de comparações múltiplas entre proporções (Zar, 1999).

3.5. BIOENSAIO DE APRENDIZAGEM DE *GALLUS GALLUS*

Para avaliar a influência do padrão de cores de *Methona themisto* no aprendizado de *Gallus gallus*, no que se refere ao reconhecimento e rejeição visual de presas impalatáveis,

486 pintinhos ingênuos foram submetidos a contatos consecutivos com larvas vivas de *Methona*
487 *themisto*, enquanto pintinhos experientes (que já tiveram contato com larvas dessa espécie)
488 foram submetidos a larvas palatáveis pintadas no mesmo padrão de cores de *Methona*
489 *themisto*.

490 Após o período de treinamento, lotes de pintinhos ingênuos foram testados contra
491 larvas vivas de *Methona themisto* de 3° e 5° instares, como descrito anteriormente. Cada
492 indivíduo foi submetido a três dias consecutivos de testes. As larvas de 1° instar não foram
493 utilizadas nos testes devido à sua alta taxa de predação observada nos outros ensaios desse
494 estudo. A reação do predador também foi registrada por um período de 2 minutos como: 1.
495 atacada e ingerida; 2. atacada e não ingerida; 3. não atacada.

496 Após os três dias de testes com larvas vivas, aos pintinhos testados com larvas de 3°
497 instar (pintinhos experientes) foram oferecidas larvas de *Tenebrio molitor* liofilizadas e
498 pintadas, com tinta plástica Acrilex® no padrão de cores da *Methona themisto*, listras
499 transversais laranjas e pretas intercaladas. A sequência oferecida a cada indivíduo foi: 1.
500 larva de *Tenebrio molitor* liofilizada; 2. larva de *Tenebrio molitor* liofilizada e pintada de
501 laranja e preto; 3 larva de *Tenebrio molitor* liofilizada e pintada de marrom (cor do
502 *Tenebrio molitor*); 4. larva de *Tenebrio molitor* liofilizada.

503 **3.5.1. Análise estatística do bioensaio de aprendizagem com *Gallus gallus***

504 Para a análise dos dados foram realizados testes G de contingência para avaliar se o
505 comportamento dos pintinhos em relação às presas era independente do número de contatos
506 e independente da coloração da presa (Zar, 1999).

507

508 4. RESULTADOS

509 4.1. SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS. INFLUÊNCIA DE PREDADORES

510 4.1.1. Sobrevivência das larvas de *Methona themisto* em mata secundária versus 511 ambiente urbano

512 As curvas de sobrevivência das larvas de *Methona themisto* (Figuras 5, 6, 7 e 8)
513 foram comparadas através do Teste de Log-rank e devido às várias comparações com o
514 mesmo conjunto de dados, empregou-se a correção de Bonferroni (p -crítico $< 0,0125$).

515 As comparações entre os ambientes testados mostraram que a sobrevivência das
516 larvas não diferiu significativamente em plantas protegidas de predadores (mata secundária
517 versus ambiente urbano, Log-rank, $p = 0,092$) e em plantas desprotegidas (mata secundária
518 versus ambiente urbano, Log-rank, $p = 0,530$).

519 As comparações feitas entre os tratamentos testados resultaram em diferença não
520 significativa na sobrevivência das larvas em ambiente urbano (plantas protegidas versus
521 desprotegidas, Log-rank, $p = 0,022$), mas apontaram uma forte influência da predação na
522 sobrevivência dessas larvas em mata secundária (plantas protegidas versus desprotegidas,
523 Log-rank, $p < 0,0001$).

524 Durante o acompanhamento das larvas, no tratamento desprotegido, não houve
525 observação direta de nenhum ataque de predadores às larvas, constatando apenas o
526 desaparecimento dessas larvas. Apesar dos estágios larvais serem o foco deste estudo, as
527 pupas de *Methona themisto* também foram acompanhadas. As pupas, ao contrário das
528 larvas, foram observadas sendo atacadas por formigas de uma espécie não identificada da
529 subfamília Myrmicinae (Figura 7A) e por vespas da espécie *Agelaia vicina* Saussure 1854
530 (Hymenoptera: Vespidae), no ambiente de mata secundária. Não houve diferença

531 significativa entre as proporções de sobrevivência das pupas entre plantas protegidas e
532 desprotegidas, em mata secundária (comparação entre proporções, $p = 0,25$), mas em
533 ambiente urbano há uma diferença significativa na proporção de sobrevivência das pupas
534 em plantas protegidas e desprotegidas, onde 88% das protegidas sobreviveram contra 42%
535 das desprotegidas (comparação entre proporções, $p < 0,0001$).

536 **4.2. BIOENSAIOS COM LARVAS VIVAS DE *METHONA THEMISTO***

537 **4.2.1. Bioensaio com *Camponotus crassus***

538 Todas as colônias de formigas predaram as larvas de 5º ínstar ($n = 10$) (Figura 7B).
539 Após uma semana, os testes foram refeitos e todas as larvas foram novamente predadas. As
540 colônias de *Camponotus rufipes* (2 colônias) e *Camponotus rengerii* (3 colônias) também
541 predaram todas as larvas.

542 Em todos os ensaios, as larvas reagiram agressivamente frente aos predadores, que
543 as reconheciam facilmente nas folhas e logo as carregavam em direção ao ninho. As larvas
544 contorceram-se, muitas vezes tentaram morder as formigas e sempre regurgitavam, fazendo
545 até com que algumas formigas se afastassem incomodadas com a secreção do regurgito,
546 contudo as larvas sempre acabavam cedendo ao ataque maciço das formigas.

547 **4.2.2. Bioensaio com *Lycosa erythrognatha***

548 Os bioensaios com *Lycosa erythrognatha* demonstraram que larvas de *Methona*
549 *themisto* não apresentam defesas contra este tipo de predador; os bioensaios com 30
550 aranhas e larvas de 5º ínstar resultaram em 100% de predação (Figura 7C). Após uma
551 semana os testes foram refeitos e todas as larvas foram novamente predadas, demonstrando

552 que tais predadores não são sensíveis às prováveis defesas químicas das larvas, mesmo em
553 um segundo contato.

554 **4.2.3. Bioensaio com *Oxyopsis saussurei***

555 Em dois dias não consecutivos de testes, os 10 indivíduos de *Oxiopsis saussurei*
556 (Figura 7D) capturaram as larvas de *Methona themisto* de 5º ínstar, contudo a porcentagem
557 de ingestão das larvas decresceu de 100 % a zero (as larvas do primeiro contato tiveram
558 mais de 50% de seu corpo ingerido e as do segundo contato foram rapidamente rejeitadas
559 sofrendo poucas lesões, contudo, fatais) e o tempo de manipulação da presa diminuiu
560 significativamente no segundo dia de teste (teste t pareado, $p = 0,012$, Figura 8).

561 **4.2.4. Bioensaio com *Gallus gallus***

562 Os bioensaios com *Gallus gallus* (Figura 7E) mostraram que o comportamento
563 destes em relação às presas não era independente do ínstar da larvas testadas (Teste G de
564 contingência 3×3 , $\chi^2 = 28,56$, $gl = 4$, $P < 0,0001$) (Figura 9). Quando agrupados, os
565 comportamentos larvas rejeitadas e larvas predadas, verifica-se que a predação não é
566 independente dos ínstars larvais (Teste G de contingência 2×3 , $\chi^2 = 26,38$, $gl = 2$, $P <$
567 $0,0001$), sendo que larvas de 3º e 5º ínstars são significativamente menos predadas do que
568 larvas de 1º ínstar (Teste G de contingência 2×2 , $\chi^2_{\text{corr.Yates}} = 22,88$, $gl = 1$, $P < 0,0001$).
569 Nenhuma larva de primeiro ínstar sobreviveu ao ataque, enquanto 80% e 100% das larvas
570 de terceiro e quinto ínstar respectivamente, resistiram ao ataque dos pintinhos e
571 sobreviveram até empuparem.

572 **4.2.5. Bioensaio com *Tropidurus itambere***

573 Nos ensaios com larvas de 5º ínstar, 4 indivíduos de *Tropidurus itambere* (Figura
574 7F) não aceitaram as larvas de *Methona themisto*, rejeitando-as sem mesmo prová-las, mas
575 aceitando tanto o controle inicial quanto o controle final oferecido.

576 **4.3. BIOENSAIOS COM EXTRATOS DAS PLANTAS E DAS LARVAS**

577 **4.3.1. Bioensaios no campo**

578 Os bioensaios realizados com os extratos (aquosos e diclorometânicos) da larva de
579 *Methona themisto* e sua planta hospedeira (Figura 10A), além de seus respectivos controles,
580 resultaram em 100% de predação em ambas as localidades testadas (mata secundária e
581 ambiente urbano).

582 As larvas liofilizadas de *Tenebrio molitor*, onde os extratos foram aplicados, foram
583 vistas sendo predadas por formigas, principalmente. As formigas encontradas predando
584 essas larvas pertencem a três espécies não identificadas da subfamília Myrmicinae. Outras
585 larvas parecem ter sido arrancadas da planta (Figura 10B), provavelmente por algum tipo
586 de vespa, onde apenas o tegumento preso por cola à planta permaneceu intacto. Quando as
587 formigas foram responsáveis pela retirada das larvas, elas as quebravam e acabavam
588 retirando todo o tecido preso à folha.

589 **4.3.2. Bioensaio com *Gallus gallus***

590 Os extratos da planta-hospedeira não apresentaram atividade deterrente nos
591 indivíduos de *Gallus gallus* testados, sendo que todas as larvas foram predadas. Contudo
592 quando comparamos as proporções de predação dos extratos obtidos das larvas, verificamos
593 diferenças significativas entre elas ($\chi^2 = 64,5$, $p < 0,0001$) (Figura 11). Um teste de

comparações múltiplas para proporções mostrou que o extrato diclorometânico a 1 equivalente foi significativamente menos predado do que a larva controle (sem extrato) e o extrato aquoso a 1 equivalente. O extrato diclorometânico a 5 equivalentes também foi significativamente menos predado do que o controle e o extrato aquoso a 5 equivalentes. Além disso, o extrato diclorometânico a 5 equivalentes foi significativamente menos predado do que o extrato diclorometânico a 1 equivalente.

Outra hipótese testada foi a de que alcalóides presentes nas larvas de *Methona themisto* pudessem atuar na palatabilidade destas frente a seus predadores. Entretanto quando se verifica a porcentagem de predação nos extratos neutro e alcaloidal em relação ao controle, verificamos que somente o extrato neutro apresenta atividade antipredação significativa (comparação entre múltiplas proporções, $\chi^2 = 5,09$, $p < 0,0001$) (Figura 12).

4.4. BIOENSAIO DE APRENDIZAGEM DE *GALLUS GALLUS*

Os ensaios de aprendizagem de *Gallus gallus* foram realizados apenas com larvas de 3° e 5° ínstar, as quais apresentaram maior grau de impalatabilidade para esse tipo de predador e já possuem uma coloração conspícua. As larvas de 1° ínstar foram significativamente mais aceitas pelos pintinhos e não possuem ainda o padrão de cores característicos das larvas dessa espécie de borboleta (listras transversais laranjas e pretas).

Os bioensaios com larvas de 3° ínstar mostraram que o comportamento dos pintinhos em relação às presas não era independente do número de contatos com a larva conspícua (Teste G de contingência 2 x 3, $\chi^2 = 11,76$, $gl = 2$, $P = 0,0028$) (Figura 13). Com larvas de 5° ínstar, o comportamento dos pintinhos também não foi independente do número de contatos (Teste G de contingência 2 x 3, $\chi^2 = 8,81$, $gl = 2$, $P = 0,0122$) (Figura

616 14). Ou seja, em ambos os casos, a cada contato os pintinhos tiveram uma porcentagem
617 maior de rejeição das larvas.

618 Pintinhos experientes foram postos frente a larvas palatáveis de *Tenebrio molitor*
619 pintadas no padrão de cores de *Methona themisto*, com a finalidade de avaliar sua
620 capacidade de reconhecer esse padrão e associá-lo ao gosto desagradável. Esses pintinhos
621 tiveram contato com larvas de *Methona themisto* de 3º ínstar, as quais têm um tamanho
622 similar ao das larvas de *Tenebrio molitor* no último ínstar.

623 Apenas 10% das larvas de *Tenebrio molitor*, pintadas de laranja e preto, foram
624 aceitas pelos pintinhos, enquanto as restantes foram rejeitadas visualmente. Os controles
625 utilizados no testes tiveram 100% de aceitação (larvas de *Tenebrio molitor* liofilizadas e
626 liofilizadas pintadas de marrom) (Figura 15). Assim, o comportamento dos pintinhos em
627 relação às larvas não foi independente de sua coloração (Teste G de contingência 2×4 , $\chi^2 =$
628 68,0, gl = 3, $P < 0,0001$) (Figura 16).

629 Além disso, pintinhos ingênuos foram testados para confirmar se a sua capacidade
630 de reconhecer o padrão de cores da *Methona themisto* ocorre apenas através de experiência
631 prévia. Todos os 27 indivíduos testados ingeriram as larvas pintadas de marrom, de laranja
632 e preto e aquelas sem coloração alguma.

633

634 5. DISCUSSÃO

635 Os resultados obtidos sugerem que as larvas de *Methona themisto* possuem defesas
636 químicas, contudo com eficácia diferenciada para seus diferentes predadores.

637 O acompanhamento da sobrevivência dessas larvas, em diferentes condições, aponta
638 a forte influência de seus predadores sobre sua sobrevivência. O efeito da predação foi
639 evidente no ambiente de mata secundária, onde as larvas sobreviveram menos em plantas
640 desprotegidas. As larvas mostraram-se também extremamente resistentes às perturbações
641 urbanas, não apresentando assim, diferenças entre área urbana ou mata secundária. A
642 diferença não significativa entre a sobrevivência de plantas protegidas e desprotegidas, em
643 área urbana, pode ser entendida considerando as diferenças no conjunto de predadores
644 existentes em cada uma das áreas. Apesar de não constar neste trabalho o levantamento das
645 potenciais espécies predadoras de cada região, pode-se considerar que em ambientes
646 naturais ocorra um maior número de predadores e também um maior número de predadores
647 especializados nesse tipo de larvas.

648 Nos bioensaios com larvas vivas optou-se pelo uso de larvas de 5º ínstar, que pode
649 ser considerado ínstar mais capaz de defender-se de artrópodes predadores (Hayes, 1981;
650 Kristensen, 1994) e por se considerar que seu maior grau de conspicuidade reflita uma
651 maior proteção química (toxicidade ou impalatabilidade) (Ruxton et al., 2004). Assim, em
652 caso de respostas negativas a essas defesas, pode-se supor a falta ou a ineficácia de defesas
653 químicas nessas larvas para os predadores testados.

654 Trabalhos relacionados a predação de larvas de lepidópteros por formigas e outros
655 predadores invertebrados, observaram larvas de diferentes espécies sendo menos atacadas
656 quando estas se alimentavam em plantas com compostos impalatáveis (Dyer, 1995, 1997;
657 Dyer & Bowers, 1996). Dyer e Bowers (1996) mostraram que larvas de *Junonia coenia*

658 (Nymphalidae) alimentadas em folhas (ricas em glicosídeos iridióides) conseguiam escapar
659 mais dos ninhos de formigas do que larvas alimentadas com uma dieta pobre em
660 glicosídeos iridióides. Portugal e Trigo (2005) demonstraram que larvas de *Mechanitis*
661 *polymnia* apresentavam uma camuflagem química sobre as folhas de sua planta hospedeira
662 e não eram identificadas como presas por formigas *Camponotus crassus*. No entanto, a
663 total aceitação das larvas de *Methona themisto* como presas por *Camponotus crassus* indica
664 a ineficiência de suas defesas químicas contra esse predador, como já havia sido
665 anteriormente verificada por Portugal (2001).

666 O resultado obtido no ensaio com as aranhas foi semelhante ao das formigas.
667 Experimentos com mariposas arctídeas, *Utheteisa ornatrix*, já comprovaram que aranhas
668 do gênero *Lycosa* respondem às defesas químicas, rejeitando presas impalatáveis (Eisner &
669 Eisner, 1991). Indivíduos de *Lycosa ceratiola* rejeitaram fêmeas adultas de *Utheteisa*
670 *ornatrix* que continham alcalóides pirrolizidínicos adquiridos após a cópula ou mesmo
671 larvas palatáveis do besouro *Tenebrio molitor* quando uma solução de monocrotalina era
672 aplicada próxima de suas quelíceras, após o ataque. A aplicação dessa solução fazia com
673 que as aranhas liberassem a larva e tentassem limpar seu aparelho bucal, esfregando-o na
674 areia (Gonzalez et al., 1999). As aranhas da família Lycosidae são um excelente indicador
675 na avaliação de presas com alcalóides pirrolizidínicos, assim como outras aranhas
676 cursoriais de Ctenidae, Pisauridae e Trechaleidae (Paulo Cesar Motta, comunicação
677 pessoal). Em nossos experimentos, as defesas químicas das larvas de *Methona themisto*
678 mostraram-se ineficazes, já que em todos os ensaios as aranhas atacaram prontamente as
679 larvas, sugando todo seu conteúdo e depois macerando o tegumento restante, sem deixar
680 sobras.

681 Os ensaios com mantídeos, no entanto, revelaram que as defesas de *Methona*
682 *themisto* podem atuar contra alguns grupos de predadores invertebrados. Não se sabe ao
683 certo quais fatores influenciam a eficácia dessas defesas, mas os mantídeos foram os únicos
684 predadores invertebrados testados que responderam a elas. Outro trabalho já avaliou o
685 tempo de manipulação de presas tóxicas por louva-a-deuses (Berembaum & Miliczky,
686 1984). Eles observaram que não só o tempo de manipulação diminuía a cada novo contato
687 com a presa, como eles também conseguiam reconhecer a aparência da presa tóxica, não a
688 manipulando, mesmo quando estas não apresentavam toxicidade.

689 Nos predadores vertebrados, contudo, como os lagartos (*Tropidurus itambere*) e os
690 pintinhos (*Gallus gallus*) a defesa parece atuar não só no aspecto da palatabilidade como
691 também na coloração de advertência. Os resultados obtidos nos experimentos com lagartos
692 reforçam a influência da coloração de alerta na aceitação de presas, em predadores
693 experientes. Os experimentos de Boyden (1976) com lagartos *Ameiva ameiva*
694 demonstraram que essa espécie rejeita borboletas impalatáveis do gênero *Heliconius*
695 baseados no reconhecimento da coloração ou padrão das asas e na presença de compostos
696 impalatáveis. Além disso, bastaram poucos contatos para que os lagartos aprendessem a
697 evitar presas desse tipo. Os ensaios de Reznick et al. (1981) mostraram que os lagartos
698 *Sceloporus malachiticus* apresentavam uma relutância inicial em ingerir presas com certos
699 padrões de cores. Assim, a rejeição das larvas de *Methona themisto* pelos lagartos
700 *Tropidurus itambere* talvez tenha ocorrido devido às experiências prévias desses
701 indivíduos, que foram coletados já na fase adulta ou ainda devido à característica inata de
702 evitar presas de coloração vistosa. Esses lagartos são comuns em áreas urbanas, assim
703 como a *Methona themisto*, e por isso são bons modelos de predadores devido ao seu hábito
704 insetívoro.

Os pintinhos, entretanto, apresentaram diferentes respostas para os diferentes ínstares larvais. Testes estatísticos confirmaram que a respostas dos pintinhos em relação às larvas era dependente de seu estágio larval, sendo as larvas de 1° ínstar significativamente mais predadas do que as de 3° e 5°. É provável que haja então um incremento na impalatabilidade da larva no decorrer de seu desenvolvimento sobre sua planta-hospedeira, como demonstrou o teste com este predador generalista. Esses dados confirmam o que as análises de sobrevivência já indicavam: que há uma maior mortalidade para os primeiros estágios de desenvolvimento. Pode se verificar que além do aumento da rejeição ao longo do desenvolvimento larval, há também o aumento da conspicuidade da larva. Com a aparente baixa concentração de defesas químicas nas larvas de 1° ínstar, associada a uma coloração relativamente críptica, parece plausível que larvas tão pequenas e frágeis dificilmente sobrevivam a um primeiro contato com o predador. Para as larvas maiores, a partir do 3° ínstar, quando a coloração da larva se torna evidente, a associação da cor com o gosto desagradável, parece atuar como uma boa estratégia de defesa, já que agora as larvas sobrevivem com até 100% de sucesso (larvas de 5° ínstar).

Os testes de aprendizagem dos pintinhos demonstraram que as respostas dadas por esses predadores eram dependentes do número de contatos com a presa conspícua, ou seja, que bastam poucos contatos com a presa impalatável para se obter uma resposta de rejeição visual. Já no terceiro contato com as larvas vivas, todos os pintinhos passaram a evitá-las. Alguns pintinhos, desde o primeiro contato, já se mostravam perturbados com a presença da larva de *Methona themisto*. Esse comportamento se intensificou a cada contato com a presa. Entretanto, ingeriam o controle palatável instantaneamente. Outros trabalhos já mostraram que aves predadoras relutam em provar presas coloridas, mesmo se elas nunca tiveram oportunidade em aprender que aquelas presas são tóxicas (Coppinger, 1969; Morrel

729 & Turner, 1970; Schuler & Hesse, 1985). A relutância inicial em aceitar presas com
730 coloração vistosa auxilia também a compreensão da maior aceitação das larvas de 1º instar
731 do experimento anterior.

732 Alguns modelos teóricos foram propostos para explicar a manutenção da
733 conspicuidade em presas impalatáveis ou tóxicas. Harvey et al. (1982) propuseram um
734 modelo onde a coloração aposemática poderá evoluir pelo aumento da taxa de detecção
735 enquanto ela favorecer o aprendizado rápido para evitar presas desagradáveis. O modelo de
736 Arnold (1978) prediz que é melhor o aprendizado do que a rejeição inata. Os experimentos
737 de Guilford (1985) sugeriram que a coloração de alerta deve ser conspícua para reduzir
738 erros de reconhecimento por predadores experientes através de um efetivo aumento na
739 distância de detecção. Roper e Redston (1987) provaram que a conspicuidade afeta
740 diretamente tanto a força do aprendizado inicial como a duração dele na memória das aves.

741 Tais fatos apontaram ainda outra questão: se apenas o padrão de cores das larvas de
742 *Methona themisto* estaria sinalizando ao predador que aquela presa possui características
743 desagradáveis. Outros trabalhos já haviam confirmado a função aposemática de diversas
744 cores (vermelho, laranja, amarelo e branco) associada ao preto (Poulton, 1980; Cott, 1940;
745 Lindstrom, 2001) e do laranja isoladamente (Ritland, 1998). Assim, o emprego de uma
746 larva palatável pintada na coloração semelhante a da *Methona themisto* (listras transversais
747 laranjas e pretas) indicou que apenas pintinhos experientes são capazes de relacionar a cor
748 com o gosto desagradável, rejeitando assim uma presa palatável. A influência da tinta foi
749 descartada devido à unânime aceitação da larva teste pintada na coloração críptica
750 (marrom). Os pintinhos ingênuos, frente às larvas pintadas de preto e laranja, não reagiram
751 como aqueles que tiveram contato com as larvas vivas de *Methona themisto* pela primeira
752 vez. Esses pintinhos não ficaram perturbados ao vê-las e as ingeriram rapidamente. A

753 coloração, apesar de auxiliar o reconhecimento de presas desagradáveis, pode não ser a
754 única característica atuando nesse sentido. Talvez a associação da coloração com odores
755 das larvas de *Methona themisto* ajudem a sinalizar sua impalatabilidade. Roper e Marples
756 (1997) mostraram que alguns odores poderiam estar associados com rejeição por gostos
757 desagradáveis, contudo outros não. Exnerová et al. (2006) verificaram que os pássaros
758 testados por eles não foram capazes de discriminar as presas a partir de seus odores.
759 Nossos experimentos evidenciam que as respostas dos pintinhos às larvas pintadas eram
760 dependentes de sua coloração, quando estes possuíam experiência com presas
761 desagradáveis com o mesmo padrão de cores.

762 Embora o fato dos extratos da planta hospedeira não apresentarem atividade
763 biológica no campo e nem contra os pintinhos sugerirem que as defesas químicas existentes
764 nas larvas de *Methona themisto* não derivem do seqüestro de compostos das plantas,
765 devemos ressaltar que os compostos responsáveis pela proteção química da larva de
766 *Methona themisto* não foram caracterizados, sendo que eles deviam se encontrar em baixas
767 quantidades nas concentrações testadas da planta hospedeira.

768 Os resultados dos ensaios com os extratos das larvas e pintinhos fortalecem a
769 hipótese de que predadores vertebrados são mais sensíveis às defesas químicas de *Methona*
770 *themisto*. A comparação da predação das larvas palatáveis pintadas com extratos aquosos e
771 diclorometânicos (nas concentrações equivalentes a 1 e a 5 larvas de *Methona themisto*) e
772 larvas-controle, mostrou que o extrato diclorometânico a 5 equivalentes foi
773 significativamente menos predado do que os outros, sugerindo que os compostos
774 defensivos de *Methona themisto* encontram-se nessa fase do extrato. Os ensaios com
775 extratos alcaloidais comprovam que os compostos responsáveis pela rejeição não são
776 alcalóides, já que o extrato neutro, que é similar ao extrato diclorometânico, foi o que

777 apresentou menor porcentagem de predação. A identificação dos compostos ativos nesse
778 extrato deverá ser investigada no futuro.

779 Dessa forma, esses dados apontam a presença de defesas químicas em *Methona*
780 *themisto*, contudo com ação e eficácia diferencial para os diferentes tipos de predadores
781 vertebrados e invertebrados testados, sendo mais eficientes contra predadores vertebrados
782 visualmente orientados.

783

784 **6. CONCLUSÃO**

785 Pode-se concluir, a partir dos resultados obtidos, que as larvas de *Methona themisto*
786 possuem uma defesa química eficaz principalmente contra predadores vertebrados
787 visualmente orientados e que os compostos responsáveis por essa defesa encontram-se na
788 fração diclorometânica (apolar) dos extratos obtidos das larvas.

789

790 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 791 Alves MN, Sartorato A, Trigo, JR (2007) Scopolamine in *Brunfelsia uniflora* (Solanaceae):
 792 defense, allocation, costs and induced response. *Journal of Chemical Ecology* 33:
 793 297-309.
- 794 Arnold SJ (1978) The evolution of a special class of modifiable behaviours in relation to
 795 environmental pattern. *American Naturalist* 112: 415-427.
- 796 Attygalle AB (1998) Microchemical techniques Pp. 207-294 in Millar JG, Haynes KF (eds)
 797 *Methods in Chemical Ecology: Chemical Methods*. v. 1. Norwell, MA: Kluwer
 798 Academic Press.
- 799 Bates HW (1862) Contributions of an insect fauna of the Amazon valley, Lepidoptera:
 800 Heliconidae. *Transactions of the Linnean Society of London* 23: 495-566.
- 801 Bekkouche K, Daali Y, Cherkaoui S, Veuthey JL, Christen P (2001) Calystegine
 802 distribution in some solanaceous species. *Phytochemistry* 58: 455-462.
- 803 Bellows TS Jr, Owens JC, Huddleston EW (1982) Predation of range caterpillar,
 804 *Hemileuca oliviae* (Lepidoptera: Saturniidae) at various stages of development by
 805 different species of rodents in New Mexico during 1980. *Environmental*
 806 *Entomology* 11: 1211-1215
- 807 Berenbaum M (1986) Post-ingestive effects of phytochemicals on insects: on Paracelsus
 808 and plant products. Pp. 123-154 in Miller TA, Miller J (eds) *Insect plant*
 809 *interactions*. New York: Springer-Verlag.
- 810 Berenbaum MR, Miliczky, E (1984) Mantids and milkweed bugs: efficacy of aposematic
 811 colorations against invertebrate predators. *American Midland Naturalist* 111: 64-68.

- 812 Blum MS (1983) Detoxication, deactivation, and utilization of plant compounds by insects.
813 Pp. 265-275 in Hedin PA (ed) Plant resistance to insects. Washington DC: ACS
814 Symposium series 208. American Chemical Society.
- 815 Boppré M (1978) Chemical communication, plant relationships, and mimicry in the
816 evolution of danaid butterflies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24: 264-
817 277.
- 818 Bowers MD (1992) The evolution of unpalatability and the cost of chemical defense in
819 insects. Pp 216-244 in Isman MB, Roitberg BD (eds) *Insect chemical ecology: an*
820 *evolutionary approach*. New York: Chapman & Hall.
- 821 Bowers MD (1993) Aposematic caterpillars life-styles of the warningly colored and
822 unpalatable. Pp 331-371 in Stamp NE, Casey TM (eds) *Caterpillars: ecological and*
823 *evolutionary constraints on foraging*. New York: Chapman & Hall.
- 824 Bowers MD, Puttick GM (1986) The fate of ingested iridoid glycosides in lepidopteran
825 herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 12: 169-178.
- 826 Boyden TC (1976) Butterfly palatability and mimicry: experiments with *Ameiva* lizards.
827 *Evolution* 30:73-81.
- 828 Brattsten LB (1986) Fate of ingested plant allelochemicals in herbivorous insects. Pp. 211-
829 255 in Brattsten LB, Ahmad S (eds) *Molecular aspects of insect plant associations*.
830 New York: Pleem um.
- 831 Brower LP (1984) Chemical defense in butterflies. Pp 109-134 in Vane-Wright RI &
832 Ackery PR (eds) *The biology of butterflies*. New York: Academic Press.
- 833 Brower LP, Brower JVZ (1964) Birds, butterflies and plant poisons: a study in ecological
834 chemistry. *Zoologica* 49:137-159.

- 835 Brown KS (1980) Insetos aposemáticos: Indicadores naturais de plantas medicinais.
836 Ciência e Cultura 32 (suplemento): 189-200.
- 837 Brown KS (1984) Adult-obtained pyrrolizidine alkaloids defend ithomiinae against a spider
838 predator. Nature 309: 707-709.
- 839 Brown KS (1985) Chemical ecology of dehydropyrrolizidine alkaloids in adult Ithomiinae
840 (Lepidoptera, Nymphalidae). Revista Brasileira de Biologia 44: 435-460.
- 841 Brown KS (1987) Chemistry at the Solanaceae/Ithomiinae interface. Annals of the Missouri
842 Botanical Garden 74: 359-397.
- 843 Cardoso MZ (1997) Testing chemical defence based on pyrrolizidine alkaloids Animal
844 Behaviour 54: 985-991.
- 845 Chow YS, Tsai RS (1989) Protective chemicals in caterpillar survival. Experientia 45: 390-
846 397.
- 847 Clarke CA, Dickson CGC, Sheppard PM (1963) Laval color pattern in *Papilio demodocus*.
848 Evolution 17: 130-137.
- 849 Coppinger RP (1969) The effect of experience and novelty on avian feeding behavior with
850 reference to the evolution of warning coloration in butterflies. I. Reactions of wild-
851 caught adult blue jays to novel insects. Behaviour 35: 45-60.
- 852 Coppinger RP (1970) The effect of experience and novelty on avian feeding behavior with
853 reference to the evolution of warning coloration in butterflies. II. Reactions of naïve
854 birds to novel insects. American Naturalist 104: 323-335.
- 855 Cott HB (1940) Adaptive coloration in animals. London: Methuen & Co Ltda.
- 856 Dempster JP (1984) The natural enemies of butterflies. Pp 97-104 in Vane-Wright RI &
857 Ackery PR (eds) The biology of butterflies. New York: Academic Press.

- 858 DeVries PJ (1991) Evolutionary and ecological patterns in myrmecophilous riodinid
859 butterflies. Pp 143-156 in Huxley CR, Cutler DF (eds) Ant-plant interactions.
860 Oxford: Oxford Academic Press.
- 861 Drummond BA III (1976) Comparative ecology and mimetic relationships of ithomiine
862 butterflies in eastern Ecuador. Ph.D. Dissertation, University of Florida, Gainesville,
863 Florida.
- 864 Drummond BA III (1981) Ecological chemistry, animal behavior, and plant systematics.
865 Solanaceae Newsletter 2: 59-66.
- 866 Dyer LA (1995) Tasty generalists and nasty specialists? Antipredator mechanisms in
867 tropical Lepidopteran larvae. Ecology 76: 1483-1496.
- 868 Dyer LA,. Bowers MD (1996) The importance of sequestered iridoid glycosides as a
869 defense against an ant predator. Journal of Chemical Ecology 22: 1527-1539.
- 870 Edgar JA (1975) Danainae and 1,2-dehydropyrrolizidine alkaloid-containing plants – with
871 reference to observations made in New Hebrides. Philosophical Transactions of the
872 Royal Society 272: 467-476.
- 873 Edgar JA (1982) Pyrrolizidine alkaloids sequestered by Solomon Island danaine butterflies.
874 The feeding preferences of the Danainae and Ithomiinae. Journal of Zoology
875 (London) 196: 385-399.
- 876 Edgar JA (1984) Parsonsieae: ancestral larval foodplants of the Danainae and Ithomiinae.
877 Pp. 91-96 in Vane-Wright RI & Ackery PR (eds) The biology of butterflies. New
878 York: Academic Press.
- 879 Edgar JA, Cockrum, PA, Carrodus BB (1979) Male scent-organ chemicals of the vine
880 moth, *Phalaenoides glycinae* Lew. (Agaristidae). Experientia 35: 861-862.

- 881 Edgar JA, Culvenor CCJ (1974) Pyrrolizidine ester alkaloid in danaid butterflies. Nature
882 248: 614-616.
- 883 Edgar JA, Culvenor CCJ, Pliske TE (1974) Coevolution of Danaid butterflies with their
884 host plants. Nature 250: 646-648.
- 885 Edgar JA, Culvenor CCJ, Pliske, TE (1976) Isolation of a lactone, structurally related to the
886 esterifying acids of pyrrolizidine alkaloids, from the costal fringes of male
887 Ithomiinae. Journal of Chemical Ecology 2: 263-270.
- 888 Edgar JA, Culvenor CCJ, Robinson GS (1973) Hairpencil dihydropyrrolizines of Danainae
889 from the New Hebrides. Journal of the Australian Entomological Society 12: 144.
- 890 Edmunds M (1974) Defence in animals: a survey of antipredator defences. Essex: Longman
891 Group.
- 892 Ehrlich PR (1984) The structure and dynamics of butterfly populations. Pp. 25-40 *in* Vane-
893 Wright RI & Ackery PR (eds) The biology of butterflies. New York: Academic
894 Press.
- 895 Eisner T, Eisner M (1991) Unpalatability of pyrrolizidine alkaloid-containing moth
896 *Utheteisa ornatix* and its larvae to wolf spiders. Psyche 98:111-117.
- 897 Eisner T, Eisner M, Rossini C, Iyengar VK, Roach BL, Benedikt E, Meinwald J (2000)
898 Chemical defenses against predation in an insect egg. Proceedings of the Natural
899 Academy of Sciences of the United States of America 97: 1634-1639.
- 900 Eisner T, Johnessee JS, Carrel J, Hendry LB, Meinwald J (1974) Defensive use by an insect
901 of a plant resin. Science 184: 996-999.
- 902 Exnerová A, Svádová K, Stys P, Barcalová S, Landová E, Prokopová M, Fuchs R, Socha R
903 (2006) Importance of colour in the reaction of passerine predators to aposematic

- 904 prey: experiments with mutants of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). Biological
905 Journal of the Linnean Society 88: 143-153.
- 906 Feichtinger VE, Reavey D (1989) Changes in movement, tying and feeding patterns as
907 caterpillars grow: the case of yellow horned moth. Ecological Entomology 14: 471-
908 474.
- 909 Fisher RA (1930) The genetical theory of natural selection. Pp 230. Oxford: Clarendon
910 Press
- 911 Freitas AVL, Oliveira PS (1996) Ants as selective agents on herbivore biology: effects on
912 the behaviour of a non-myrmecophilous butterfly. Journal of Animal Ecology 65:
913 205-210.
- 914 Gardner DR, Stermitz FR (1988) Hostplant utilization and iridoid glycoside sequestration
915 by *Euphydryas anicia* (Lepidoptera: Nymphalidae). Journal of Chemical Ecology
916 14: 2147-21268.
- 917 Gittleman JL, Harvey PH (1980) Why are distasteful prey not cryptic? Nature 286:149-150.
- 918 Gittleman JL, Harvey PH, Greenwood PJ (1980) The evolution of conspicuous coloration:
919 some experiments in bad taste. Animal Behaviour 28: 897-899.
- 920 Gonzales A, Rossini C, Eisner M, Eisner T (1999) Sexually transmitted chemical defense
921 in a moth (*Utheteisa ornatix*). Ecology 96: 5570-5574.
- 922 Guilford T (1986) How do warning colours work? Conspicuousness may reduce
923 recognition errors in experienced predators. Animal Behaviour 34: 286-288.
- 924 Guilford T (1990) The evolution of aposematism. Pp 23-61 in Schmidt JO, Evans DL (eds)
925 Defense: predator-prey interactions. Syracuse NY: SUNY Press.

- 926 Harborne JB (1997) Introduction to ecological biochemistry. Pp 318 London: Academic
927 Press.
- 928 Harcourt DG (1966) Major factors in survival of the immature stages of *Pieris rapae* L.
929 Canadian Entomologist 98: 653-662.
- 930 Harvey PH, Bull JJ, Pemberton M, Paxton RJ (1982) The evolution of aposematic
931 coloration in distasteful prey: a family model. American Naturalist 93:139-148.
- 932 Hayes JL (1981) The population ecology of a natural population of the pierid butterfly
933 *Colias alexandra*. Oecologia 49: 188-200.
- 934 Heinrich B, Collins SL (1983) Caterpillar leaf damage and the game of hide-and-seek with
935 birds. Ecology 64: 592-602.
- 936 Hölldobler B, Wilson EO (1990) The ants. Pp.732. Cambridge: Belknap Press.
- 937 Hopper KR (1986) Preference, acceptance, and fitness components of *Microplitis*
938 *croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) attacking various instars of *Heliothis*
939 *virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Environmental Entomology 15: 274-280.
- 940 Janzen DH (1984) Two ways to be a tropical big moth: Santa Rosa saturniids and
941 sphingids. Oxford Surveys in Evolutionary Biology 1: 85-140.
- 942 Järvi T, Sillén-Tullberg B, Wiklund C (1981) The cost of being aposematic. An
943 experimental study of predation on larvae of *Papilio machaon* by the great tit *Parus*
944 *major*. Oikos 36: 267-272.
- 945 Jones CG, Young AM, Jones TH, Blum MS (1982) chemistry and possible roles of
946 cuticular alcohols of the larval *Atlas* moth. Comparative Biochemistry and
947 Physiology B 73: 797-801
- 948 Kleinbaum DG (1996) Survival analysis: a self-learning text. Pp 324 New York: Springer-
949 Verlag.

- 950 Klots AB (1951) A field guide to the butterflies. Pp 349 Boston: Houghton Mifflin.
- 951 Kristensen CO (1994) Investigations on the natural mortality of eggs and larvae of the large
952 white *Pieris brassicae* (L.) (Lep., Pieridae). Journal of Applied Entomology 117:
953 92-98.
- 954 Kusnezov N (1951) El género *Camponotus* en la Argentina. Acta Zoologia Lilloana 11:
955 183-255.
- 956 Lamas G (1973) Taxonomia e evolução dos gêneros *Ituna* Doubleday (Danainae) e *Paititia*,
957 gen. n., *Thyridia* Hübner e *Methona* Doubleday (Ithomiinae). Tese (Doutorado),
958 Universidade de São Paulo 225 p.
- 959 Lindigkeit R, Biller A, Buch M, Schiebel HM, Boppré M, Hartmann T (1997) The two
960 faces of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its *N*-oxide in
961 chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. European Journal
962 Biochemistry 245: 626-636.
- 963 Lindström L (2001) Experimental approaches to studying the initial evolution of
964 conspicuous aposematic signalling. Evolutionary Ecology 13: 605-618.
- 965 Lloyd HA, Fales HM, Goldman M.E, Jerina DM, Plowman T, Schultes RE (1985)
966 Brunfelsamidine - a novel convulsant from the medicinal *Brunfelsia grandiflora*.
967 Tetrahedron Letters 26: 2623-2624.
- 968 Morrell GM, Turner JRG (1970) Experiments on mimicry. I. The response of wild birds to
969 artificial prey. Behaviour 36: 116-131.
- 970 Mors WB, Ribeiro O (1957) Occurrence of scopoletin in the genus *Brunfelsia*. Journal of
971 Organic Chemistry 22: 978-979.

- 972 Müller F (1879) *Ituna* and *Thyridia*; a remarkable case of mimicry in butterflies.
 973 Transactions of the Linnean Society of London 1879: 20-29.
- 974 Nahrstedt A, Davis RH (1981) The occurrence of cyanoglucosides, linamarin and
 975 lotaustralin in *Acraea* and *Heliconius* butterflies. Comparative Biochemistry and
 976 Physiology B 68: 575-577.
- 977 Nahrstedt A, Davis RH (1983) The occurrence, variation and biosynthesis of cyanogenic
 978 glucosides Linamarin and Lotaustralin in species of *Heliconiini* (Insecta:
 979 Lepidoptera). Comparative Biochemistry and Physiology B 75: 65-73.
- 980 Nishida R (2002) Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera.
 981 Annual Review of Entomology 47: 57-92.
- 982 Olmstead RG, Palmer JD (1992) A chloroplast DNA phylogeny of the Solanaceae:
 983 subfamilial relationships and character evolution. Annals of Missouri Botanical
 984 Garden 79: 346-360.
- 985 Pinheiro CEG (2003) Does Müllerian mimicry work in nature? Experiments with
 986 butterflies and birds (Tyrannidae). Biotropica 35: 356–364
- 987 Pliske TE (1975) Attraction of lepidoptera to plants containing pyrrolizidine alkaloids.
 988 Environmental Entomology 4: 455-473.
- 989 Plowman, T. (1979) The genus *Brunfelsia*: a conspectus of the taxonomy and
 990 biogeography. Pp. 475-491 in Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD (eds) The
 991 biology and taxonomy of the Solanaceae. 1st ed. London: Academic Press.
- 992 Portugal AHA (2001) Defesa química em larvas da borboleta *Mechanitis polymnia*
 993 (Nymphalidae: Ithomiinae). Tese (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas
 994 161 p.

- 995 Portugal AHA, Trigo JR (2005) Similarity of cuticular lipids between a caterpillar and its
 996 host plant: a way to make prey undetectable for predatory ants? *Journal of Chemical*
 997 *Ecology* 31: 2551-2561.
- 998 Poulton EB (1890) The colours of animals, their meaning and use. Especially considered in
 999 the case of insects. Pp 360. London:Kegan Paul, Trench, Trübner.
- 1000 Rawlins JE (1984) Mycophagy in Lepidoptera. Pp. 382-423 in Wheeler Q & Blacwell M
 1001 (eds) *Fungus-insect relationships*. New York: Columbia University Press.
- 1002 Reznick D, Sexton OJ, Mantis C (1981) Initial prey preferences in the lizard *Sceloporus*
 1003 *malachiticus*. *Copeia* 3: 681-686.
- 1004 Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- 1005 Ritland DB (1998) Mimicry-related predation on two viceroy butterfly (*Limenitis*
 1006 *archippus*) phenotypes. *American Midland Naturalist* 140: 1-20.
- 1007 Root RB (1966) the avian response to a population outbreak of the tent caterpillar,
 1008 *Malacosoma constrictum* (Stretch) (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Pan-Pacific*
 1009 *Entomologist* 42: 48-52.
- 1010 Roper TJ, Marples NM (1997) Odour and colour as cues for taste-avoidance learning in
 1011 domestic chicks. *Animal Behaviour* 53: 1241-1250.
- 1012 Roper TJ, Redston S (1987) Conspicuousness of distasteful prey affects the strength and
 1013 durability of one-trial avoidance learning. *Animal Behaviour* 35:739-747.
- 1014 Roper TJ, Wistow R (1986) Aposematic coloration and avoidance learning in chicks.
 1015 *Quarterly Journal of Experimental Psychology* 38B: 141-149.
- 1016 Ruiter L (1952) Some experiments on the camouflage of stick caterpillars. *Behaviour* 4:
 1017 222-232.

- 1018 Ruszczyk A, Nascimento ES (1999) Biologia dos adultos de *Methona themisto* (Hübner,
1019 1818) (Lepidoptera, Nymphalidae, Ithomiinae) em praças públicas de Uberlândia,
1020 Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 59: 577-583.
- 1021 Ruxton GD, Sherratt TN, Speed MP. (2004). Avoiding attack. The evolution of crypsis,
1022 warning signals and mimicry. New York, NY: Oxford University Press.
- 1023 Salazar BA, Whitman DW (2001) Defensive tactics of caterpillars against predators and
1024 parasitoids. Pp. 161-207 in Ananthakrishnan TN (ed) Insect and plant defence
1025 dynamics. Enfield: Science Publishers.
- 1026 Schuler W, Hesse E (1985) On the function of warning coloration: a black and yellow
1027 pattern inhibits prey-attack by naive domestic chicks. *Behavioral Ecology and*
1028 *Sociobiology* 16: 249–255.
- 1029 Schultes RE (1976) Solanaceous hallucinogens and their role in the development of New
1030 World cultures. Pp 137-160 in Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD (eds) The
1031 biology and taxonomy of the solanaceae. 1st. ed. London: Academic Press.
- 1032 Sillén-Tulberg B (1985) Higher survival of an aposematic than of a cryptic form of a
1033 distasteful bug. *Oecologia* 67: 411-415.
- 1034 Sillén-Tulberg B (1988) Evolution of gregariousness in aposematic butterfly larvae: a
1035 phylogenetic analysis. *Evolution* 42: 293-305
- 1036 Silva KL (2000) Alcalóides pirrolizidínicos utilizados na defesa química em insetos contra
1037 predadores vertebrados e invertebrados. Tese (Mestrado), Universidade Estadual de
1038 Campinas 125 p.

- 1039 Silva KL, Trigo JR (2002) Structure-activity relationships of pyrrolizidine alkaloids in
1040 insect chemical defense against the orb-weaving spider *Nephila clavipes*. Journal of
1041 Chemical Ecology 28: 657-668.
- 1042 Smith SM (1975) Innate recognition of coral snake pattern by a possible avian predator.
1043 Science 187: 759-760.
- 1044 Stamp NE (1982) Behavioral interactions of parasitoids and Baltimore checkerspot
1045 caterpillars (*Euphydryas phaeton*). Environmental Entomology 11: 100-104.
- 1046 Stamp NE (1984) Interactions of parasitoids and checkerspot caterpillars *Euphydryas* spp.
1047 (Nymphalidae). Journal of Research on the Lepidoptera 23: 2-18.
- 1048 Trigo JR (2000) The chemistry of antipredator defense by secondary compounds in
1049 Neotropical Lepidoptera: facts, perspectives and caveats. Journal of the Brazilian
1050 Chemical Society 11: 551-561.
- 1051 Trigo JR (2008) Chemical ecology of ithomiine butterflies. *In*: Epifano F (org.) Current
1052 trends in phytochemistry. 1st ed. Kerala, India: Research Signpost, aceito.
- 1053 Trigo JR, Barata LES, Brown KS (1994) Stereochemical inversion of pyrrolizidine
1054 alkaloids by *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). Journal
1055 of Chemical Ecology 20: 2883-2899.
- 1056 Trigo JR, Brown KS, Witte L, Hartmann T, Ernst L, Barata LES (1996) Pyrrolizidine
1057 alkaloids: different acquisition and use patterns in Apocynaceae and Solanaceae
1058 feeding ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). Biological Journal of the
1059 Linnean Society 58: 99-123.

- 1060 Trigo JR, Motta PC (1990) Evolutionary implications of pyrrolizidine alkaloids
1061 assimilation by Ithomiinae larvae (Lepidoptera, Nymphalidae). *Experientia* 46: 332-
1062 334.
- 1063 Weller SJ (1987) *Litodonta hydromeli* Harvey (Notodontidae): description of life stages.
1064 *Journal of the Lepidopterist's Society* 41: 187-184.
- 1065 West DA, Hazel WN (1979) Natural pupation sites of swallowtail butterflies (Lepidoptera:
1066 Papilionidae) *Papilio polyxenes* Fabr., *P. glaucus* L. and *Battus philenor* L.
1067 *Ecological Entomology* 4: 387-392.
- 1068 Wiklund C, Järvi T (1982) Survival of distasteful insects after being attacked by naive
1069 birds: a reappraisal of the theory of aposematic coloration involving through
1070 individual selection. *Evolution* 36: 998-1002.
- 1071 Willmott KS, Freitas AVL (2006) Higher-level phylogeny of the Ithomiinae (Lepidoptera:
1072 Nymphalidae): classification, patterns of larval host-plant colonization and
1073 diversification. *Cladistics* 22: 1-74.
- 1074 Wink M, Schneider D (1988) Carrier-mediated uptake of pyrrolizidine alkaloids in larvae of
1075 the aposematic and alkaloid-exploiting moth *Cretonotus*. *Naturwissenschaften* 75:
1076 524-525.
- 1077 Young AM, Moffet MW (1979) Studies on the population biology of the tropical butterfly
1078 *Mechanitis isthmia* in Costa Rica. *American Midland Naturalist* 2: 309-319.
- 1079 Zar JH (1999) *Biostatistical analysis*. Pp 663. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall.

Apêndice

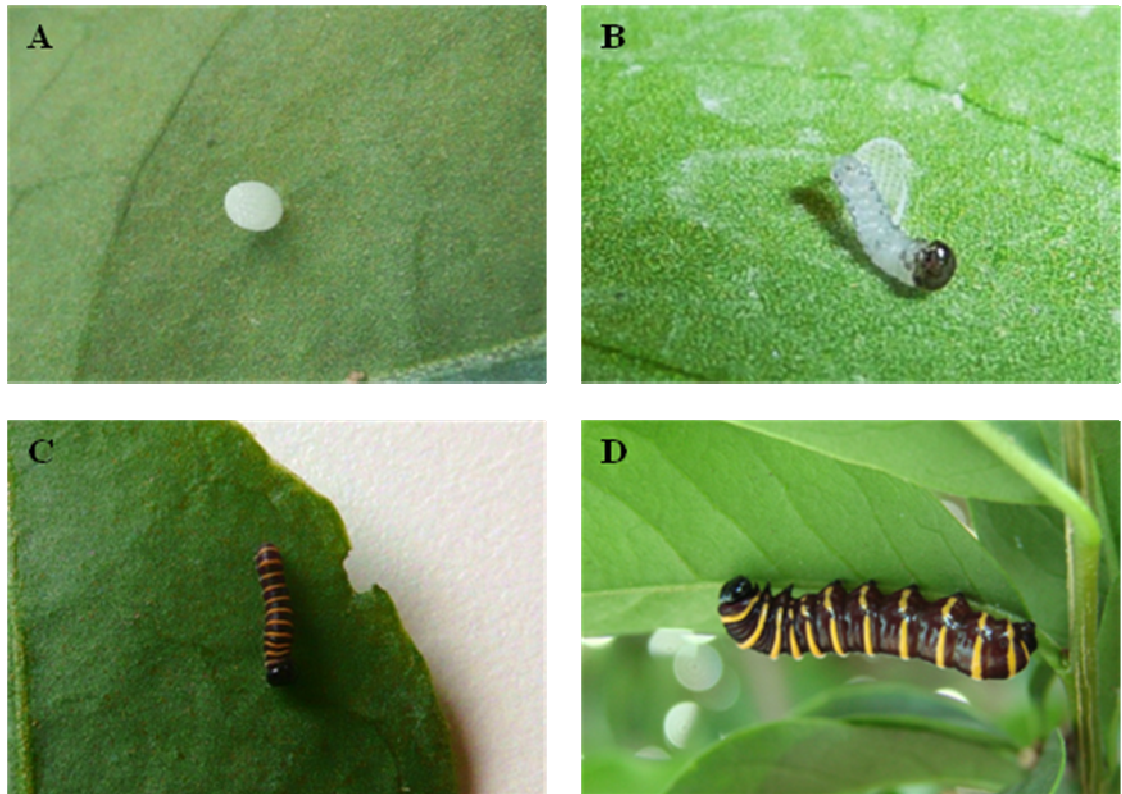


Figura 1. Estágios larvais de *Methona themisto*. A. ovo; B. larva de 1º instar; C. larva de 3º instar e D. larva de 5º instar.



Figura 2. *Brunfelsia uniflora*

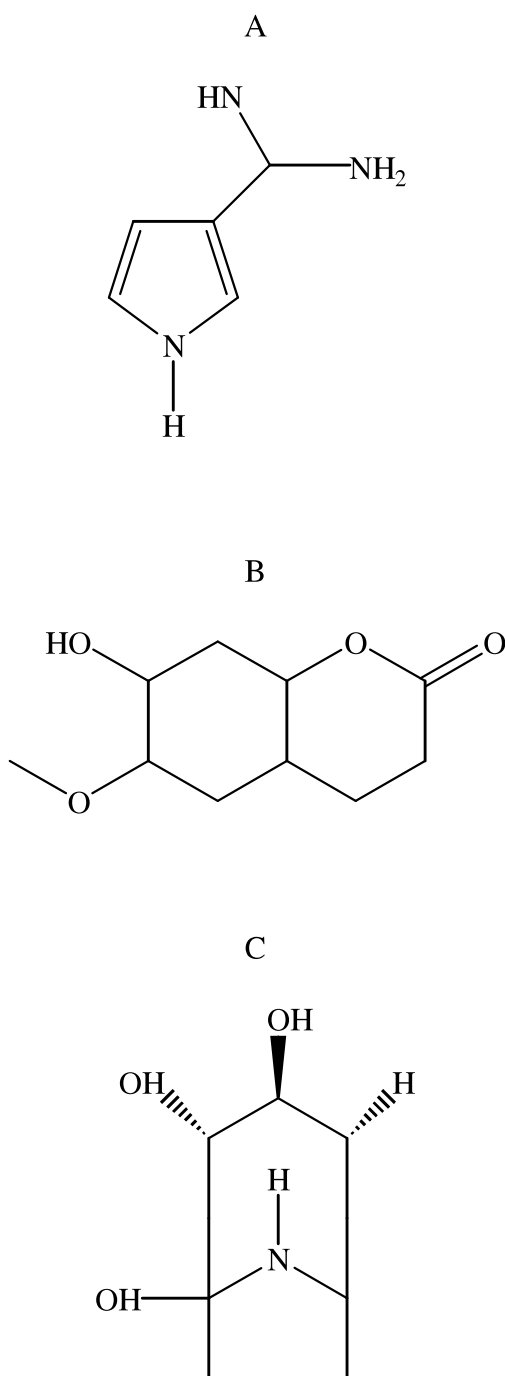


Figura 3. Alguns compostos encontrados em *Brunfelsia uniflora*. A. Brunfelsamidina; B. Escopoletina e C. Calistegina A₃.



Figura 4. Acompanhamento da sobrevivência de *Methona themisto* em plantas protegidas e desprotegidas de predadores.

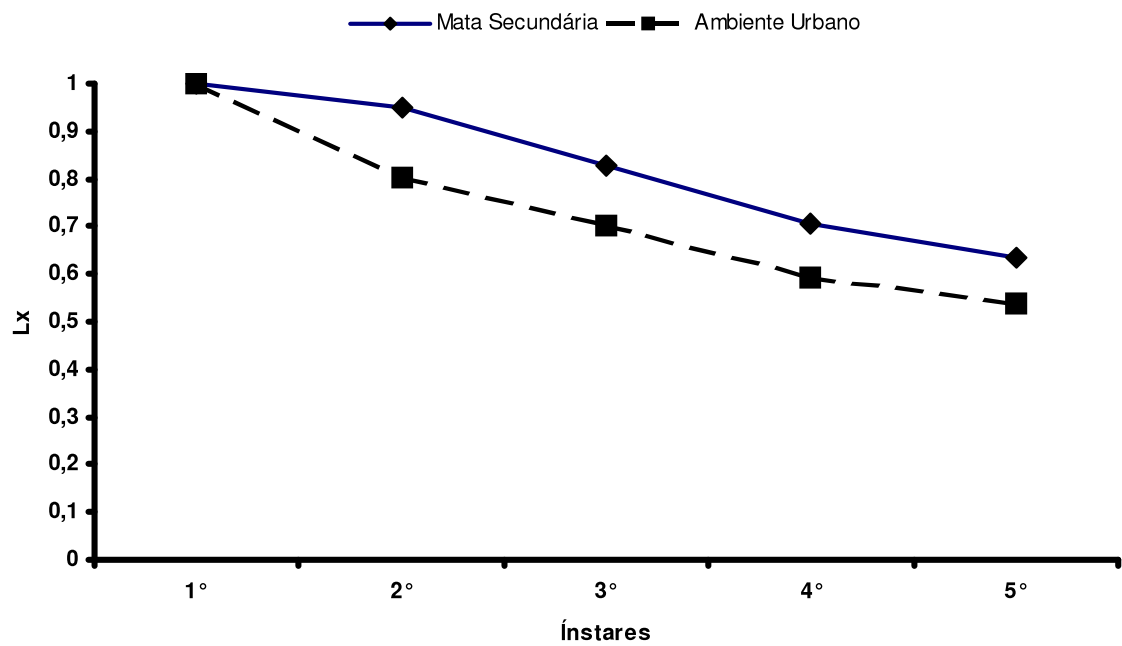


Figura 5. Curva de sobrevivência de *Methona themisto* em plantas protegidas contra predadores, em mata secundária e ambiente urbano. $L_x = n_x/n_i$ (proporção entre número de indivíduos no estágio x e o número de indivíduos no estágio inicial).

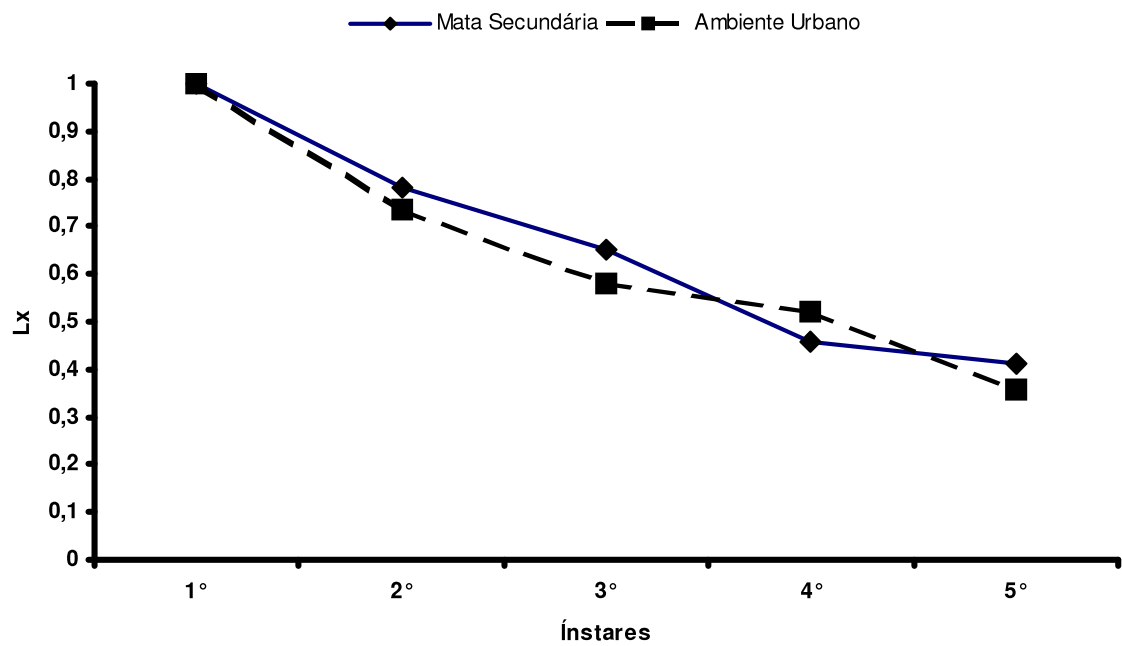


Figura 6. Curva de sobrevivência de *Methona themisto* em plantas desprotegidas contra predadores, em mata secundária e ambiente urbano. $L_x = n_x/n_i$ (proporção entre número de indivíduos no estágio x e o número de indivíduos no estágio inicial).

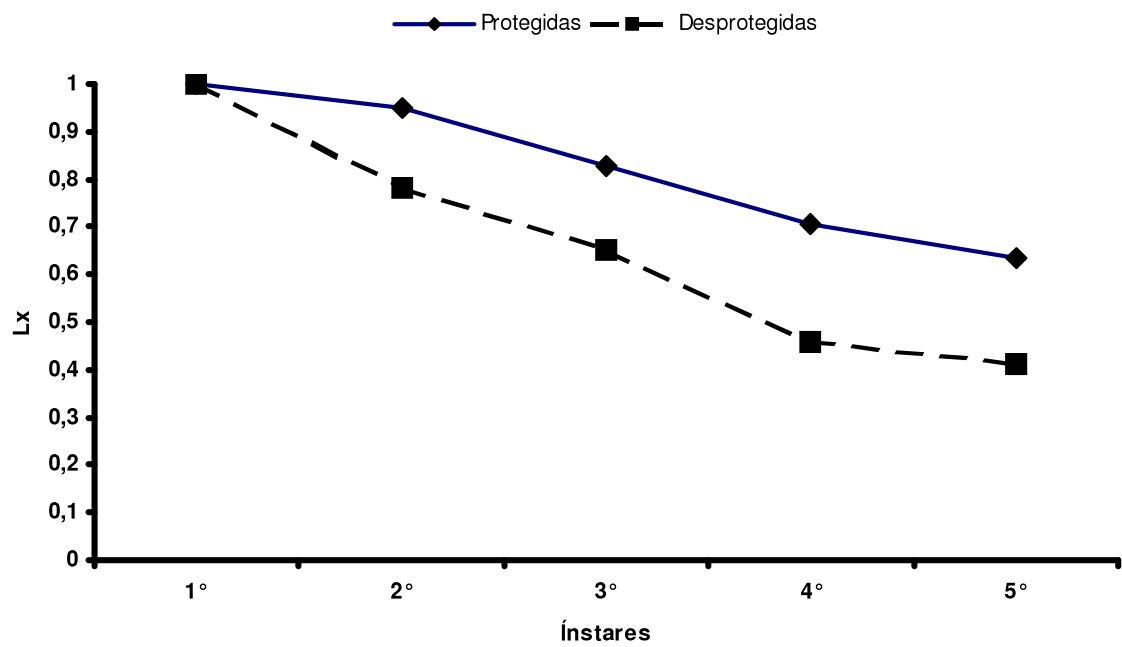


Figura 7. Curva de sobrevivência de *Methona themisto* em mata secundária. $L_x = n_x/n_i$ (proporção entre número de indivíduos no estágio x e o número de indivíduos no estágio inicial).

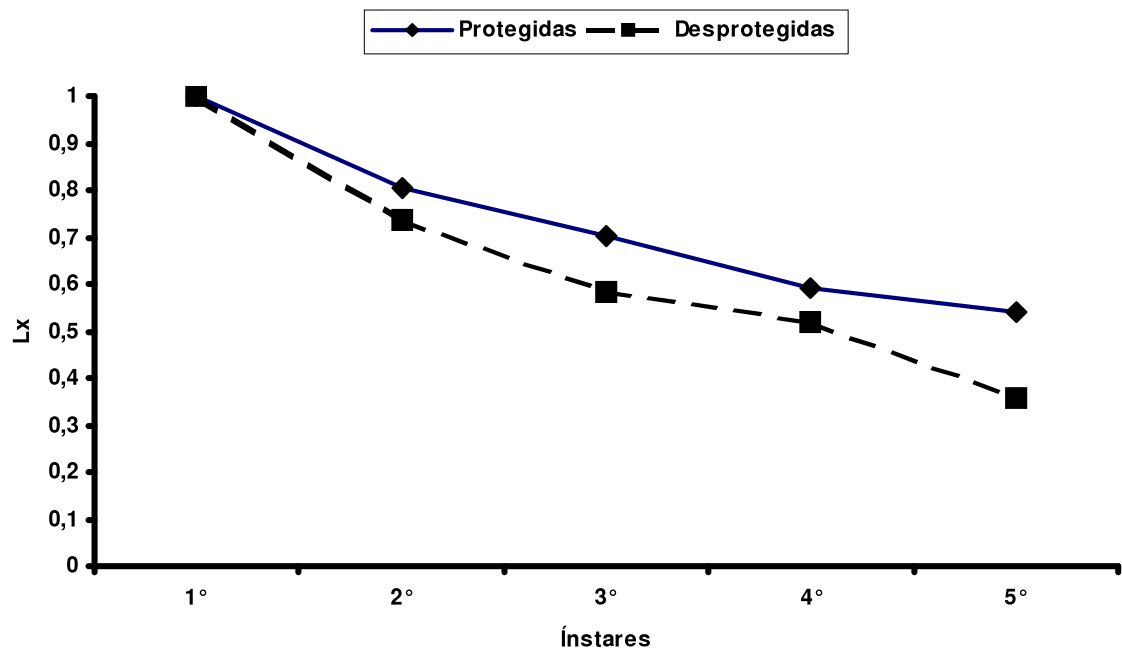


Figura 8. Curva de sobrevivência de *Methona themisto* em ambiente urbano. $L_x = n_x/n_i$ (proporção entre número de indivíduos no estágio x e o número de indivíduos no estágio inicial).

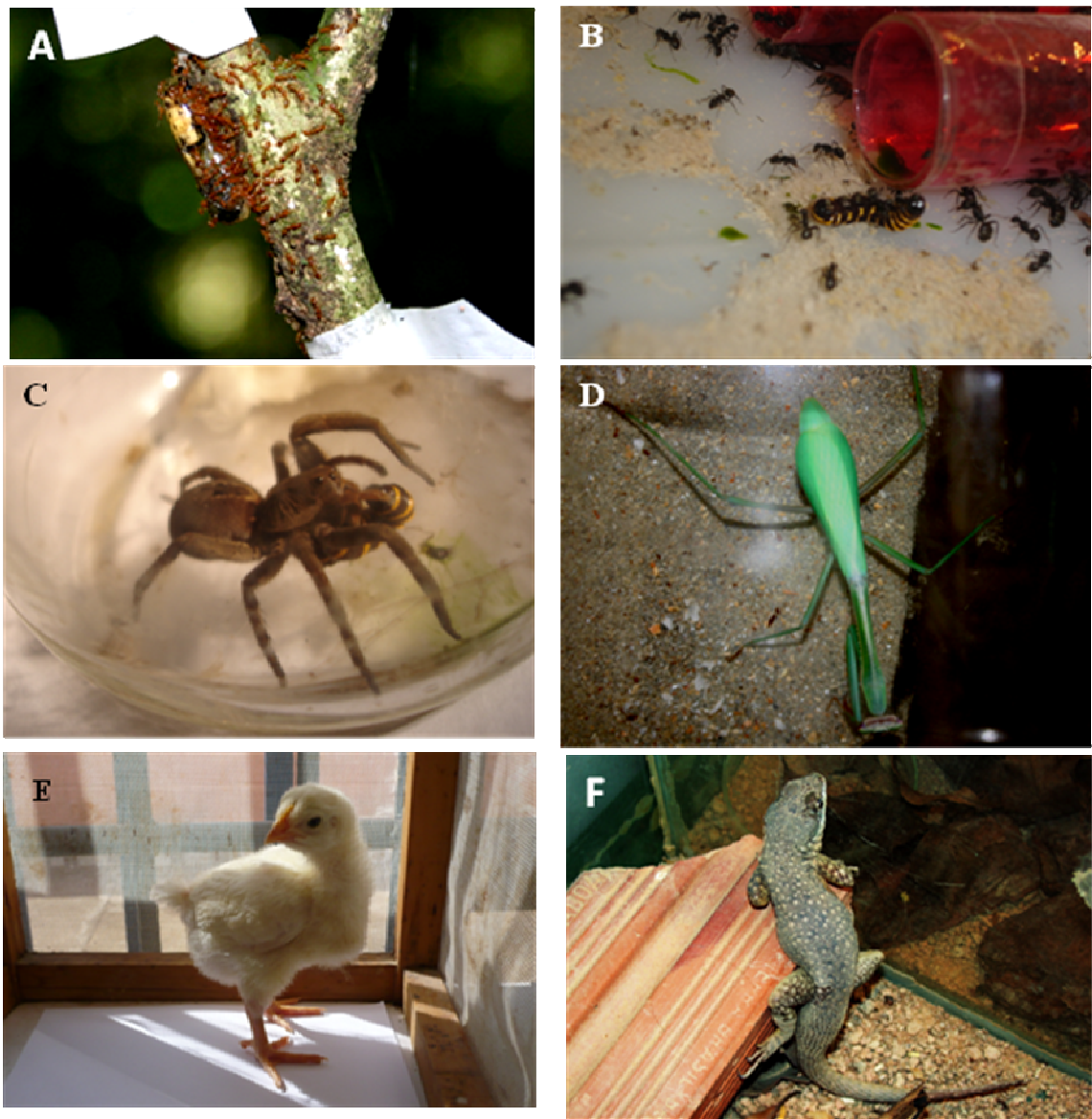


Figura 9. Acompanhamento da sobrevivência de *Methona themisto* A. Pupa predada por formigas. Bioensaios de predação com larvas de *Methona themisto* vivas B. *Camponotus crassus*; C. *Lycosa erythrognatha*; D. *Oxyopsis saussurei*; E. *Gallus gallus*; F. *Tropidurus itambere*

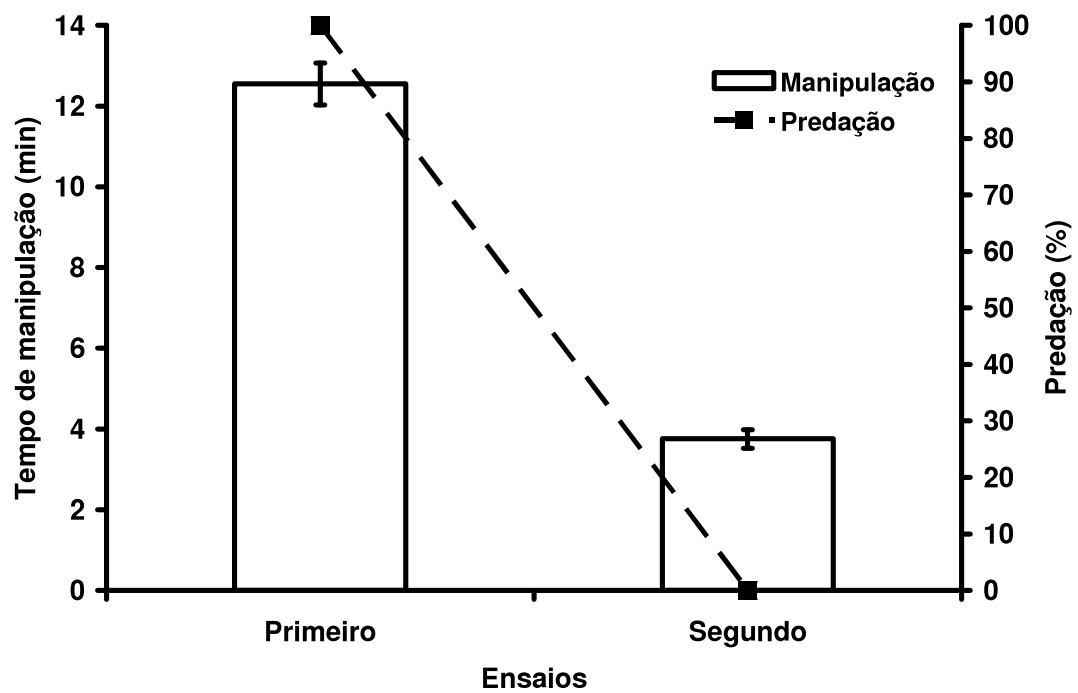


Figura 10. Tempo de manipulação e porcentagem de predação das larvas de *Methona themisto* por *Oxyopsis saussurei* em dois dias não consecutivos.

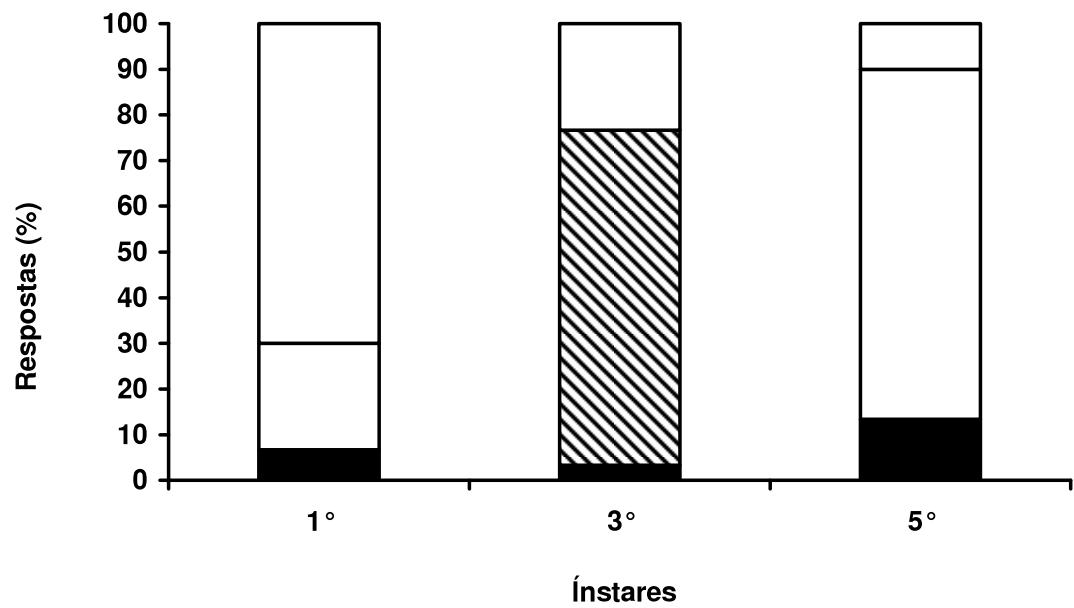


Figura 11. Comportamento de *Gallus gallus* em relação a diferentes instares larvais de *Methona themisto*. Branco: bicado e predado; Listrado: bicado e rejeitado; preto: não bicado.



Figura 12. Bioensaio em campo com extratos aplicados em larvas palatáveis de *Tenebrio molitor*. A. Larvas presas às folhas e B. Larva predada.

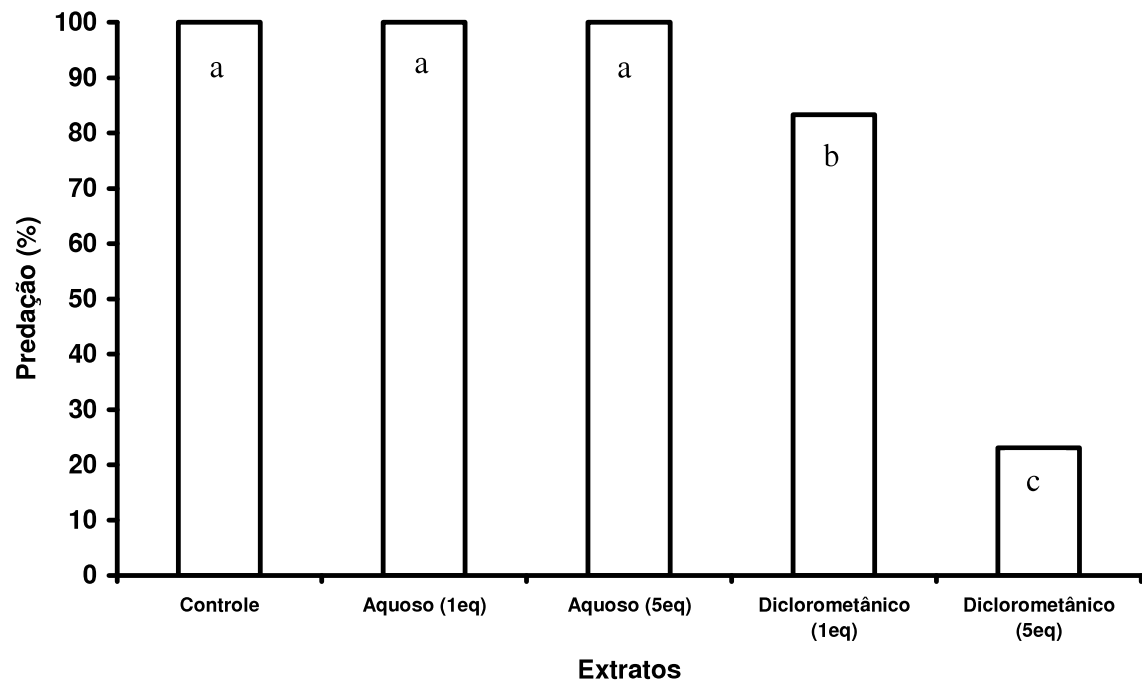


Figura 13. Predação por *Gallus gallus* em larvas de *Tenebrio molitor* tratadas com extratos de *Methona themisto*. Letras diferentes mostram diferença significativa ($P < 0.05$).

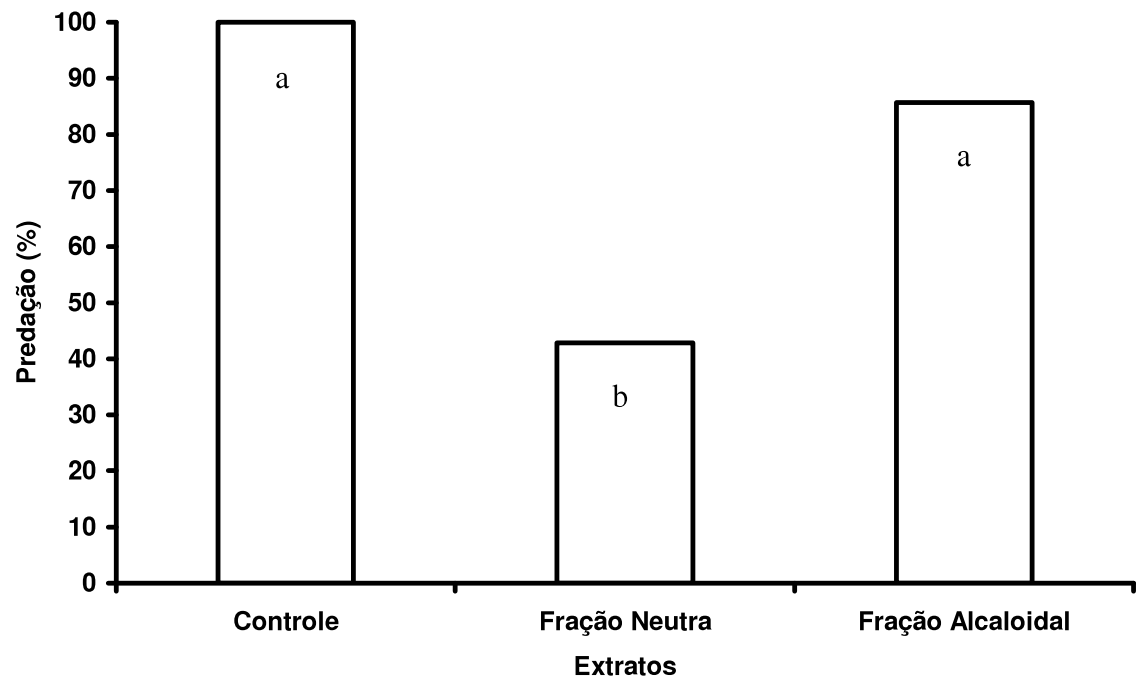


Figura 14. Predação por *Gallus gallus* em larvas de *Tenebrio molitor* tratadas com extratos de *Methona themisto*. Bioensaios com extratos provenientes da extração de alcalóides. Letras diferentes mostram diferença significativa ($P < 0.05$).

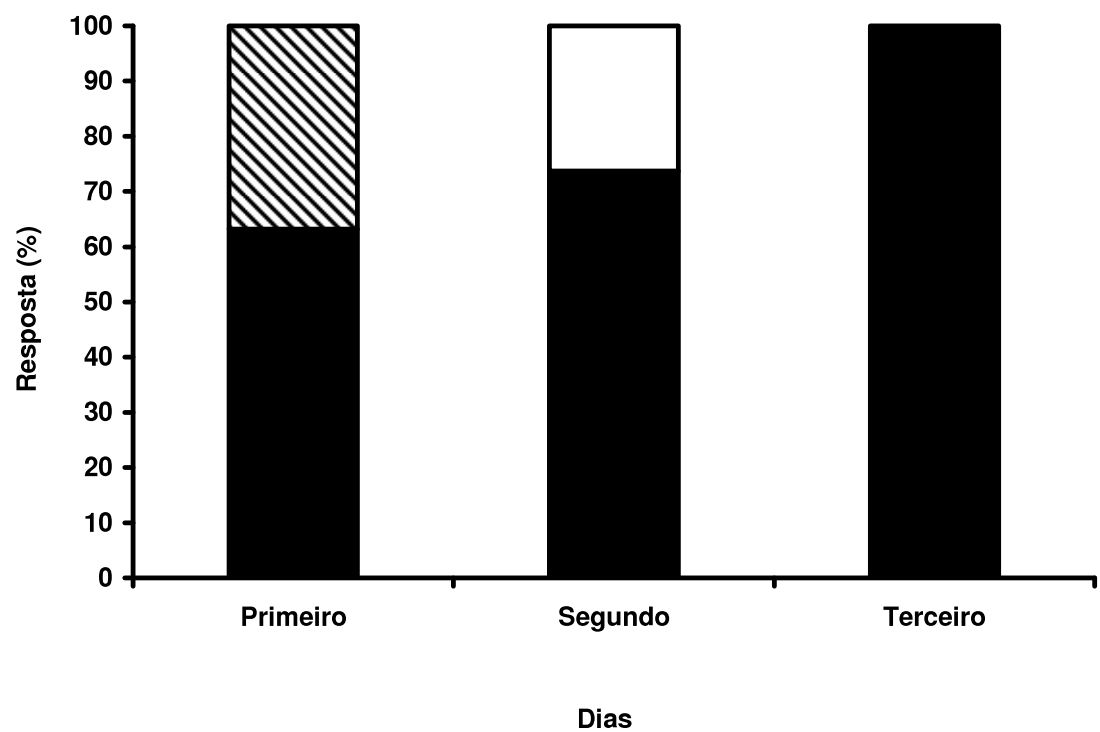


Figura 15. Comportamento de *Gallus gallus* em relação ao 3º instar larval de *Methona themisto*, as quais foram apresentadas em dias seqüenciais. Listrado: bicado e rejeitado; preto: não bicado.

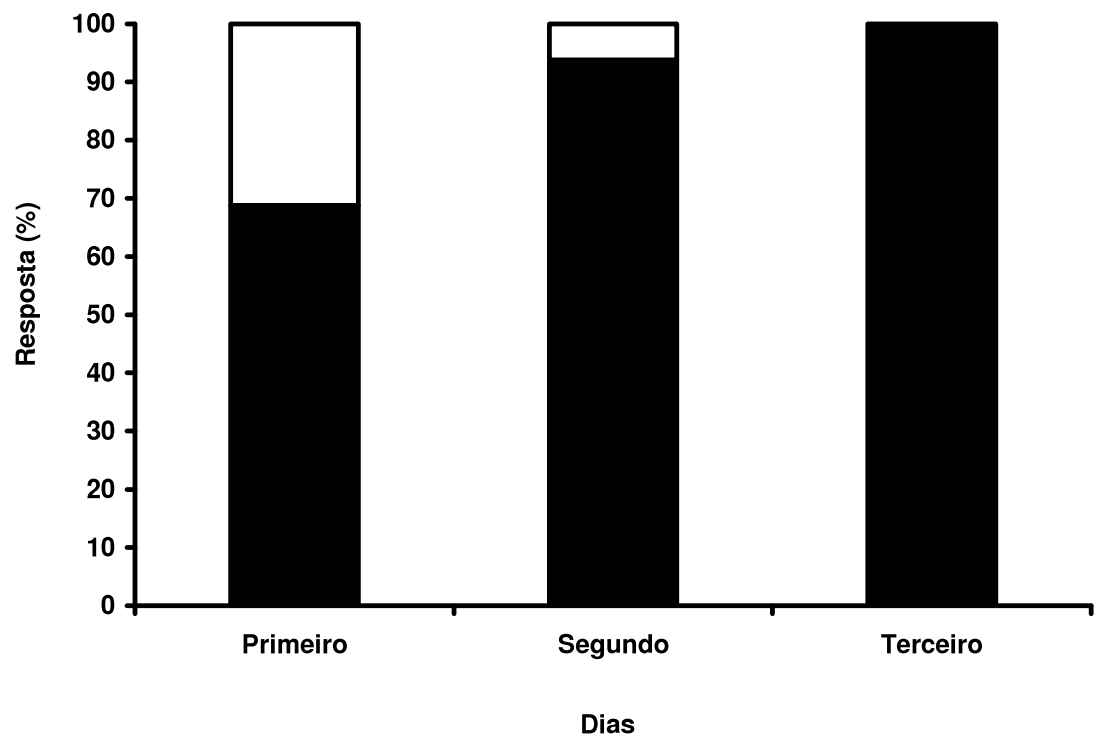


Figura 16. Comportamento de *Gallus gallus* em relação ao 5º instar larval de *Methona themisto*, as quais foram apresentadas em dias sequenciais. Listrado: bicado e rejeitado; preto: não bicado.



Figura 17. Larvas de *Tenebrio molitor*: sem pintura, pintada de marrom (críptica) e pintada no padrão de cores das larvas de *Methona themisto*.

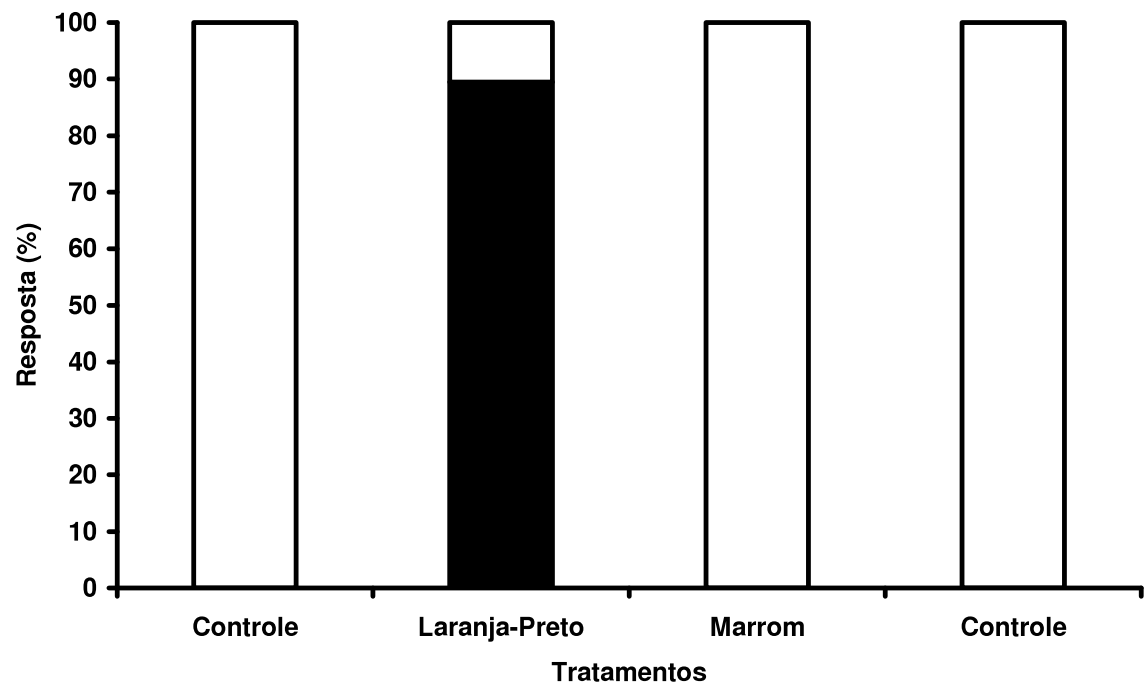


Figura 18. Comportamento de *Gallus gallus* que rejeitaram anteriormente larvas de *Methona themisto*, em relação a larvas *Tenebrio molitor* pintadas com diferentes padrões de cores. Branco: bicado e ingerido; preto: não bicado.