

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo químico e histoquímico das glândulas metapleural e labial
de formigas cortadeiras e a influência destas nas relações
simbiontes presentes nos jardins de fungo.**

Karla da Silva Malaquias*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título
de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área
de concentração: QUÍMICA
ORGÂNICA.

Orientador: João Batista Fernandes

*** bolsista FAPESP Processo 2010/02838-3**

**São Carlos - SP
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M237eq

Malaquias, Karla da Silva.

Estudo químico e histoquímico das glândulas metapleural e labial de formigas cortadeiras e a influência destas nas relações simbiotes presentes nos jardins de fungo / Karla da Silva Malaquias. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
136 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Ecologia química. 2. Formiga cortadeira. 3. Glândula metapleural. 4. Glândula labial. 5. Assepsia e antissepsia. 6. Inibição enzimática. I. Título.

CDD: 540 (20^a)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Karla da Silva Malaquias, realizada em 18/02/2015:

Prof. Dr. João Batista Fernandes
UFSCar

Profa. Dra. Ana Maria Matoso Viana Bailez
UENF

Prof. Dr. Tiago Venâncio
UFSCar

Prof. Dr. Marco Antonio Barbosa Ferreira
UFSCar

Profa. Dra. Ana Paula Terezan
UFG

"The dose makes the poison"

Theophrastus Phillipus

Aos meus pais-avós, Maria José e Alcendino (in memorium), meus pais José Carlos e Maria das Graças. Á minha querida tia Iracema (in memorium), que sempre me deram todo apoio necessário.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus sempre esteve presente em minha vida indicando os melhores caminhos a serem tomados.

Ao professor João Batista, não somente pela orientação no desenvolvimento deste trabalho, mas também pela amizade e apoio. Por sempre demonstrar valores éticos e a preocupação com a formação de pessoas, que vai além das salas de aula ou laboratórios.

Aos professores Marisa Narciso Fernandes e Marco Ferreira pela presteza em todos os momentos e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Odair Correa Bueno pela viabilização inicial da parte histoquímica e depois durante o desenvolvimento deste trabalho.

A professora Arlene Gonçalves Correa, por sempre ceder reagentes e equipamentos do laboratório de síntese quando foi necessário.

À professora Ana, professor Omar e Dra Denise, pela grande contribuição em minha formação na área de ecologia química.

Às amigas Karla, e Vanessa pela amizade e companheirismo durante o período que dividimos o mesmo teto.

Aos amigos do LZBT Natália, Larissa, Eliane, Débora, Vinicius, Driele, Marcelo e Nayara pela boa convivência.

Aos amigos chiral seleted seeds, uma família que fez minha estadia em São Carlos muito prazerosa, Cristovam, Jack, Keylla, Leila, Liliane, Moacir High, Tatiane Albarice. E a toda laboratório do PN, Ana Paula, Bruno, Bruno IC-pós doc, Evandro, Israel, Jack, Leonardo, Niculau, Roberta, Tatiane Bondancia.

Aos colegas e professores do DQ e as meninas da secretaria, Ariane, Cristina e Luciane, pela ajuda.

À minha irmã Vanuza e meus irmãos Saulo e Felipe por todo apoio e carinho.

E mais importante, a minha família, especialmente meus pais-avós e pais, por terem me dado a base e o apoio necessários, me ajudando a transformar as dificuldades em oportunidades de aprender.

À FAPESP pela bolsa concedida, Processo 2010/02838-3.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Iscas tóxicas granuladas existentes no mercado: grupo químico a que pertencem, estrutura do princípio ativo, marca comercial, e modo de ação sobre formigas cortadeiras.	19
TABELA 3.1. Volume das soluções padrões usadas no estudo da linearidade.	32
TABELA 4.1. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas metapleurais das operárias das três castas de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> .	55
TABELA 4.2. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas metapleurais das operárias das três castas de <i>Atta bisphaerica</i> .	56
TABELA 4.3. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas metapleurais das operárias das três castas de <i>Acromyrmex rugosus</i> .	57
TABELA 4.4. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas metapleurais das operárias das três castas de <i>Acromyrmex balzanii</i> .	58
TABELA 4.5. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas metapleurais das operárias das três castas de <i>Trachymyrmex fuscus</i> .	59
TABELA 4.6. Número de glândulas metapleurais necessárias para quantificação e qualificação dos constituintes nas diferentes espécies e diferentes castas.	69
TABELA 4.7. Linearidade e Sensibilidade para os padrões em estudo.	73
TABELA 4.8. Massas dos compostos presentes em <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	74
TABELA 4.9. Massas dos compostos presentes em <i>Atta bisphaerica</i> .	75
TABELA 4.10. Massas dos compostos presentes em <i>Acromyrmex rogosus</i> .	75
TABELA 4.11. Massas dos compostos presentes em <i>Acromyrmex balzanii</i> .	76
TABELA 4.12. Precisoões intra-dia e inter-dia para os extratos glandulares das espécies em estudo.	76
TABELA 4.13. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas labiais das operárias das três castas de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	93
TABELA 4.14. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas labiais das operárias das três castas de <i>Atta bisphaerica</i> .	94
TABELA 4.15. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas labiais das operárias das três castas de <i>Acromyrmex rugosus</i> .	95
TABELA 4.16. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas labiais das operárias das três castas de <i>Acromyrmex balzanii</i> .	96

TABELA 4.17. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas labiais das operárias das três castas de <i>Trachymyrmex fuscus</i>	97
TABELA 4.18. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas labiais de machos e fêmeas de <i>Acromyrmex rugosus</i>	97
TABELA 4.19. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas labiais de machos e fêmeas de <i>Acromyrmex balzanii</i> .	98
TABELA 4.20. Resultados dos ensaios de inibição com as enzimas AChE realizados e AGS.	122

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1.** Regulação da resposta imune social. A resposta de uma colônia de insetos sociais (grande círculo) a um parasita (pequeno círculo) deve levar em conta tanto a informação externa sobre o parasita (por exemplo, o seu tipo, dose e virulência) e informações internas sobre o estado da colônia. O estado colônia é determinado pela organização social dos membros da colônia, o grau de defesa profilática, e também por potenciais restrições sobre defesa anti-parasita, como o reconhecimento limitado ou capacidades de manipulação. Detalhes de como o processo de tomada de decisão ocorre (caixa preta) ainda não são compreendidas; o resultado é ou (-) ausência de ação, ou seja, a colônia se baseia exclusivamente em sua defesa profilático, ou (+) tomar medidas, ou seja, uma resposta ativa é acionada. No curto prazo, o resultado destas ações afetam o risco de infecção e eficiência de controle de parasitas da colônia, e, a longo prazo, na assepsia da colônia **5**
- FIGURA 1.2.** Polietismo etário na distribuição centrífuga. **(A)** Operárias de mesma casta e idade realizam funções semelhantes (círculos cinza), sendo que as mais jovens e rainha (representada pela coroa) e a prole (representada pelos triângulos) estão mais ao centro da colônia, enquanto as operarias adultas realizam funções nas extremidades e fora do ninho. **(B)** Na presença de um agente patogênico (círculo preto), onde não há contaminação da colônia. **7**
- FIGURA 1.3.** Tipos de defesas imunes a nível social e individual presentes em colônias de formigas. **8**
- FIGURA 1.4 -** Simbiose existente entre formigas e seus jardins de fungo. Atualmente são caracterizados cinco indivíduos nesta interação: as formigas cultivadoras de fungo da tribo Attini; o fungo simbiote; o fungo entomopatogênico *Escovopsis*; bactérias do gênero *Pseudonocardia*; leveduras negras. **11**
- FIGURA 1.5 –** Estrutura do *Candicinia D.* **12**
- FIGURA 1.6-** Levedura negra associada às formigas cultivadoras de fungo. (a) colônia de levedura negra crescendo em Agar; (b) formiga e fungo de onde a levedura negra foi isolada, *Apterostigma pilosum*; (c) levedura negra crescendo no tórax da formiga. **13**
- FIGURA 3.1.** Representação esquemática da extração para *Atta sexdens rubropilosa*; tórax 5x, glândula metapleural 20x, glândula labial 10x. **27**
- FIGURA 3.2-** Catálise da acetilcolina e reação de Ellman. **43**
- FIGURA 3.3.** O percentual de inibição foi obtido comparando-se a atividade da enzima na presença do inibidor (V_i) com a atividade inicial da enzima (V_0), de acordo com a equação: (% de inibição = $1 - [V_i - V_0] \times 100$). — Ausência de inibidor — Presença de inibidor **45**
- FIGURA 4. 1.** Microscopia eletrônica de varredura da glândula metapleural de operária de *Atta sexdens rubropilosa*. Células secretoras (sc) e canalículo extracitoplasmático (ce), Camara coletora (cc), reservatório (r); escala 10 μ m. **48**
- FIGURA 4.2.** Vista geral da glândula metapleural das três espécies **(A)** *Atta sexdens rubropilosa* mostrando célula secretora (cs), câmara coletora (cc), e reservatório (r), Barra de escala = 40 μ m **(B)** cada célula secretora (cs) possui um núcleo (nu) é ligada por um canalículo extracitoplasmático (ce) são unidades individuais, Barra de escala = **49**

10 μm (C) células secretoras (sc), detalhe da placa perfurada (pp), porção final do canalículos onde é depositada a secreção na câmara coletora (cc), Barra de escala = 10 μm .

FIGURA 4.3. Relação entre o comprimento da cápsula cefálica e diâmetro do reservatório da glândula metapleural para *Atta sexdens rubropilosa* ($r = 0.977$) 50

FIGURA 4.4. Relação entre o comprimento da cápsula cefálica e diâmetro do reservatório da glândula metapleural para *Atta bisphaerica* ($r = 0.983$) 51

FIGURA 4.5. Relação entre o comprimento da cápsula cefálica e diâmetro do reservatório da glândula metapleural para *Acromyrmex rugosus* ($r = 0.984$) 51

FIGURA 4.6. Relação entre o comprimento da cápsula cefálica e diâmetro do reservatório da glândula metapleural para *Acromyrmex balzanii* ($r = 0.988$) 52

FIGURA 4.7. Vista geral da glândula metapleural da rainha de (A) *Atta bisphaerica* mostrando célula secretora (cs), câmara coletora (cc), e reservatório (r), Barra de escala = 40 μm (B) cada célula secretora (cs) possui um núcleo (nu) é ligada por um canalículo extracitoplasmático (ce) são unidades individuais, Barra de escala = 10 μm (C) rainha de *Acromyrmex rugosus*, detalhe células secretoras (sc), detalhe da placa perfurada (pp), porção final do canalículo onde é depositada a secreção na câmara coletora (cc), Barra de escala = 10 μm . *Acromyrmex balzanii* (D) focalizando célula secretora (cs), câmara coletora (cc) Barra de escala = 20 μm (E) detalhe da célula secretora (cs), núcleo (nu) e canalículo extracitoplasmático (ce) são unidades individuais, Barra de escala = 10 μm (F) detalhe da placa perfurada (pp), porção final do canalículo onde é depositada a secreção na câmara coletora (cc), Barra de escala = 10 μm .

FIGURA 4.8 *Atta bisphaerica* (A, D e G); *Acromyrmex rugosus* (B, C e H) e *Acromyrmex balzanii* (E-F) Células secretoras (cs), núcleo (n), reservatório (r), câmara coletora (cc), canalículo intracitoplasmático (ci), canalículo extracitoplasmático (ce), lignina epitélio (le) e cutícula íntima (cut), seta mostrando grânulos de ácidos lipídicos Barra de escala = 10 μm . 61

FIGURA 4.9. Cromatograma obtido dos extratos hexânicos de *Atta sexdens rubropilosa*, ---- operárias maiores, ----- operárias médias, ----- operárias mínimas. 63

FIGURA 4.10. Estruturas sugeridas para compostos presentes na glândula metapleural de *Atta sexdens rubropilosa*. 64

FIGURA 4.11. Exemplo de triglicerídeo. 66

FIGURA 4.12. Cromatograma obtido dos extratos hexânicos de *Acromyrmex rugosus*. 66

FIGURA 4.13. Cromatograma obtido dos extratos hexânicos de *Trachymyrmex fuscus*. 67

FIGURA 4.14. Estruturas sugeridas para compostos presentes na glândula metapleural de *Trachymyrmex fuscus*. 67

FIGURA 4.15. Cromatograma de íons totais obtidos para as espécies de Attini analisadas. 71

FIGURA 4.16. Espectros de RMN ^1H obtidos pelo modo tradicional (A) e por HR-MAS 81

(B) para rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*.

FIGURA 4.17. Microorganismos isolados de *Atta sexdens rubropilosa* (a) *Escovopsis weberi* (b) *Fusarium* sp. (c) *Cunninganella* sp. (d) *Beauveria bassiana*. 1- Extrato glandular; 2- ácido octanóico; 2- ácido decanóico, 3- ácido dodecanóico, 5- ácido mirístico; 6- ácido palmítico; 7- ácido 3-hidroxi-dodecanóico, 8- ácido 3-hidroxi-decanóico; 9-; 10- ácido indol acético; 11- ácido fenil acético; 12- palmitato de butila; 13- dodecanoato de isopropila. 83

FIGURA 4.18. Microorganismos isolados de *Atta bisphaerica* (a) *Escovopsis weberi* (b) *Fusarium* sp. (c) *Cunninganella* sp. (d) *Beauveria bassiana*. 1- Extrato glandular; 2- ácido octanóico; 2- ácido decanóico, 3- ácido dodecanóico, 5- ácido mirístico; 6- ácido palmítico; 7- ácido 3-hidroxi-dodecanóico, 8- ácido 3-hidroxi-decanóico; 9-; 10- ácido indol acético; 11- ácido fenil acético; 12- palmitato de butila; 13- dodecanoato de isopropila. 84

FIGURA 4.19. Microorganismos isolados de *Acromyrmex rogosus* (a) *Escovopsis weberi* (b) *Fusarium* sp. (c) *Cunninganella* sp. (d) *Beauveria bassiana*. 1- Extrato glandular; 2- ácido palmítico; 3- dodecanoato de isopropila, 4- ácido 3-hidroxi-hexanóico, 5- ácido 3-hidroxi-octanóico; 6- ácido indolacético; 7- escatol; 8- palmitato de butila; 9- ácido oléico. 85

FIGURA 4.20. Microorganismos isolados de *Acromyrmex balzanii* (a) *Escovopsis weberi* (b) *Fusarium* sp. (c) *Cunninganella* sp. (d) *Beauveria bassiana*. 1- Extrato glandular; 2- ácido palmítico; 3- dodecanoato de isopropila, 4- ácido 3-hidroxi-hexanóico, 5- ácido 3-hidroxi-octanóico; 6- ácido indolacético; 7- escatol; 8- palmitato de butila; 9- ácido oléico. 86

FIGURA 4.21. Glândula labial de operária de *Atta sexdens rubropilosa*, (A) Microscopia de luz mostrando as principais porções descritas por Caetano (2000), células secretoras (CS), reservatório (R), ducto (d) e canalículo (seta), barra de escala 50 µm. (B) detalhe da superfície com microscopia eletrônica de varredura das células secretoras, barra de escala 10 µm. 88

FIGURA 4.22. Vista geral da glândula labial de *Atta sexdens rubropilosa*, (A) células secretoras (sc), secreção (s) e reservatório (r), Barra de escala = 100 µm. (B) ducto central (d) do reservatório, células secretoras (sc) e núcleo (nu) Barra de escala = 10 µm. (C) Detalhe da secreção (s) Barra de escala = 20 µm. (D) Detalhe da célula secretora central envolta por células parietais (cp), vesículas secretoras (vs), secreção (s) dentro da célula e os canalículos transportadores (seta) Barra de escala = 10 µm. 90

FIGURA 4.23. Detalhe do ácinio operária de *Atta sexdens rubropilosa*, mostrando células central (cc), núcleo da células central (nu), canalículo (c), células parietais (cp), vesículas secretoras (vs). Barra de escala 10 µm. 91

FIGURA 4.24. *Atta bisphaerica*, machos (A-B) azul de bromofenol e (K) Sudan Black para detecção de lipídeos (seta grânulos); fêmeas (C) PAS (seta grânulos de polissacarídeos); (F) Alcian blue. *Acromyrmex rugosus*: machos (D) PAS (seta grânulos de polissacarídeos); (M-N) Sudan Black para detecção de lipídeos (seta grânulos); fêmeas (E) PAS (seta grânulos de polissacarídeos); (H) alcian blue (I) Azul de nilo para detecção de lipídeos ácidos e (L) Hematoxilina/eosina. *Acromyrmex balzanii*: fêmeas (G) PAS (seta grânulos de polissacarídeos); machos (J) Azul de Nilo para detecção de lipídeos ácidos (O) Sudan Black para detecção de lipídeos seta grânulos), (P) Hematoxilina e eosina. Células secretoras (cs), núcleo (n), reservatório (r), células parietais (cp), canalículo (ca), vesículas secretoras (vs), secreção (s). Barra 99

de escala = 10 mm.

- FIGURA 4.25.** Compostos presentes na glândula labial das Atinis estudadas. 101
- FIGURA 4.26. A e B)** Reação para detecção de SDH com grânulos positivos (*) no citoplasma e concentrados na região nuclear. **C e D)** Reação para detecção de atividade de ATPsintase ácida. Notar a presença de grânulos positivos (*) no citoplasma (c). Núcleo (seta), citoplasma (c), canalículo (ca). **E e F)** Reação para detecção de atividade de ATP sintase alcalina, todos os tipos celulares apresentaram reação negativa. Barra = 20 μ m. 103
- FIGURA 4.27.** Esquema geral da síntese dos derivados da cerulenina. 109
- FIGURA 4.28.** Síntese dos aldeídos alifáticos, octanal (**4**), decanal (**5**) e dodecanal (**6**) 110
- FIGURA 4.29.** Espectro de massas do octanal. 110
- FIGURA 4.30.** Síntese dos ésteres α,β insaturados, 2-octenoato de etila (**7**), 2-decenoato de etila (**8**) e 2-dodecenoato de etila (**9**) 111
- FIGURA 4.31.** 2-octenoato de etila 111
- FIGURA 4.32.** Epoxidação nucleofílica dos ésteres α,β insaturados, 2-epoxi-octanoato de etila (**10**), 2-epoxi-decanoato de etila (**11**) e 2-epoxi-dodecenoato de etila (**12**) 112
- FIGURA 4.33.** Espectro de Espectro de RMN ^1H do 2-epoxi-octanoato de etila (**10**) em CDCl_3 a 400 MHz 112
- FIGURA 4.34.** Preparação das epóxi-cetonas, 4-etil-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**21**), 4-butil-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**22**), 4-dodeca-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**23**), 4-benzil-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**24**). 114
- FIGURA 4.35-** Espectros de RMN ^1H (**A**) 5-benzil-furan(5H)-ona (**20**) e (**B**) 4-dodeca-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**23**) em CDCl_3 a 400 MHz. 115
- FIGURA 4.36.** Preparação dos análogos di-carbônicos, 3-propionil-oxirano-2-carboxiamida (**29**), 3-pentanoil-oxirano-2-carboxiamida (**30**), 3-tridecanoil-oxirano-2-carboxiamida (**31**), 3-pentilacetil-ioxirano-2-carboxiamida (**32**). 116
- FIGURA 4.37-** Espectro de RMN ^1H e ^{13}C do 3-tridecanoil-oxirano-2-carboxiamida (**31**) em CDCl_3 a 400 MHz. 117
- FIGURA 4.38** – Curvas de sobrevivências de operárias submetidas a ensaios de ingestão com o composto **30** em 3 concentrações. 119
- FIGURA 4.39**– Curvas de sobrevivências de operárias submetidas a ensaios de ingestão com o composto **3** em 3 concentrações. 119
- FIGURA 4.40** – Curvas de sobrevivências de operárias submetidas a ensaios de ingestão com o composto **32** em 3 concentrações. 120
- FIGURA 4.41.** Ensaio de inibição sobre o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. 123

RESUMO

ESTUDO QUÍMICO E HISTOQUÍMICO DAS GLÂNDULAS METAPLEURAL E LABIAL DE FORMIGAS CORTADEIRAS E A INFLUÊNCIA DESTAS NAS RELAÇÕES SIMBIONTES PRESENTES NOS JARDINS DE FUNGO. Formigas cortadeiras são consideradas os insetos mais derivados do planeta. A eficiência na manutenção das condições assépticas das colônias é um fator fundamental do sucesso ecológico destas formigas. Diversos meios de defesa são usados pelas formigas, entre eles destacam-se a defesa química e as associações mutualísticas. Sendo que a última é variável, pois é dependente da espécie e/ou ambiente em que se encontram os ninhos. Assim o presente trabalho buscou um estudo mais detalhado do modo de ação da defesa química, a forma que esta se manifesta em diferentes espécies de formigas cortadeiras, que apresentam distintos graus de derivação. O estudo foi dividido em duas partes, na primeira investigou-se a composição química e histoquímica das glândulas metapleural e labial de cinco espécies de formigas cortadeiras. Foram identificados e quantificados ácidos, e hidróxi-ácidos como principais constituintes. Estes têm ação antimicrobiana frente a patógenos presentes na colônia. A concentração e proporção dos compostos tem relação direta com espécie e casta. As análises histoquímicas revelaram grande semelhança entre as espécies, demonstrando uma relação com a função destas glândulas. Enzimas que desempenham importante papel na ordem social foram evidenciadas pelos experimentos histoenzimáticos. Na segunda parte, uma vez que foi conhecida a morfologia das glândulas, a busca de inibidores de enzimas presentes na glândula que conferem proteção natural à colônia para quebrar a defesa química natural. Uma enzima que desempenha papel de grande importância na secreção dos ácidos, é a ácido-graxo sintase (AGS). Nesta etapa do trabalho, foram sintetizados análogos da cerulenina, inibidores conhecidos das AGS, a fim de estudar a relação estrutura-atividade destes compostos.

ABSTRACT

CHEMICAL AND HISTOCHEMICAL STUDY OF THE METAPLEURAL AND LABIAL GLAND FROM LEAF-CUTTING ANTS AND THE INFLUENCE OF THESE IN SYMBIONTS RELATIONS PRESENT IN FUNGUS GARDENS. Leaf-cutting ants are considered the most derived insects on the planet. The performance in maintaining the aseptic conditions of the colonies is a key factor of the ecological success of these ants. Several defenses are used by ants, among them stand out chemical defense and mutualistic associations. The last of which is variable as it is dependende the species and / or environment in which they are the nests. So this article aims at a more detailed study the action of chemical defense mode, the form it manifests itself in different species of leaf-cutting ants, which have different degrees of derivation. The study was divided into two parts, the first investigated the chemical and histochemical composition of metapleural and labial glands of five species of leaf-cutting ants. Acids and hydroxy acids were identified and quantified, as main cosntituintes. These have antimicrobial action to pathogens present in the colony. The concentration and ratio of the compounds is directly related to species and variety. Histochemical analyzes revealed great similarity between species, demonstrating a relationship with the function of these glands. Enzymes that play an important role in the social order were evidenced by histoenzimáticos experiments. In the second part, as it was known the morphology of the glands, the search for inhibitors of enzymes present in the gland that provide natural protection to the colony to break the natural chemical defense. An enzyme that plays a major role in the secretion of acid is the fatty-acid synthase (FAS). At the present stage, cerulenin analogues were synthesized, known inhibitors of FAS in order to study the structure-activity relationship of these compounds

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 – OS SUPERORGANISMOS.....	3
1.2 – Imunidade Social.....	4
1.3 – Estratégias Sociais de Defesa.....	4
1.3.1. Comportamental.....	5
1.3.2. Imunidade Organizacional.....	6
1.3.3. Química.....	7
1.4. Estratégias de Defesa em Formigas Cortadeiras.....	8
1.4.1. Imunidade Inata.....	9
1.4.2. Imunidade Molecular.....	9
1.4.3. Poliandria.....	10
1.4.4. Associações.....	10
1.4.5. Defesa Química em Formigas Cortadeiras.....	13
1.5. Técnicas Analíticas Aplicadas à Identificação Estrutural de Semioquímicos.....	15
1.6 Controle de Insetos por Inibição Enzimática.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	23
3.1. EQUIPAMENTOS.....	23
3.1.1. Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear.....	23
3.1.2. Espectrofotômetro de Ultravioleta (UV).....	23
3.1.3. Cromatógrafo de CLAE.....	23
3.1.4. Espectrômetro de Massas.....	23
3.1.5. Espectrômetro de Massas de Alta Resolução.....	24
3.1.6. Espectrofotômetro de Infravermelho (IV).....	24
3.1.7. Eletroforese Capilar.....	24
3.1.8. Rotaevaporadores.....	24
3.2. MATERIAIS PARA CROMATOGRAFIAS.....	24
3.2.1. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	24
3.2.2. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP).....	24
3.2.3. Colunas para Clae.....	25
3.2.4. Fases Estacionárias.....	25
3.2.5. Colunas Cromatográficas de Bancadas de Vidro.....	25
3.2.6. Solventes para Cromatografia.....	25
3.2.7. Solventes para Obtenção dos Espectros de RMN.....	25
3.2.8. Reveladores para CCD.....	25
3.4. FORMIGAS.....	26
3.4.1. Morfometria.....	27
3.4.2. Técnica da Hematoxilina de Harris – Eosina Aquosa.....	27
3.5 ANÁLISES HISTOQUÍMICAS.....	28
3.5.1. Técnica do Azul de Bromofenol para Detecção de Proteínas Totais (Pearse, 1985).....	28

3.5.2. Técnica do Pas/Alcian Blue para Detecção de Polissacarídeos (Glicoproteínas) com Grupamentos 1-2 Glicol e Polissacarídeos Ácidos (Junqueira e Junqueira, 1983).....	30
3.5.4. Técnica do Sudan Black para Detecção de Lipídios Totais (Bermes, 1957).....	30
3.6. ANÁLISES QUÍMICAS.....	31
3.6.1. Cromatografia Gasosa Aliada a Espectrometria de Massas....	31
3.6.2. Validação do Método Cromatográfico.....	31
3.7 ANÁLISES HISTO-ENZIMÁTICAS DA GLÂNDULA LABIAL.....	37
3.8. ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS PATÓGENOS DE <i>Atta Sexdens Rubropilosa</i>.....	35
3.8.1- Preparo dos Meios de Cultura	36
3.8.2- Isolamento dos Microrganismos	36
3.8.3 - Purificação e Isolamento dos Microorganismos.....	37
3.8.4- Preservação dos Microrganismos	37
3.9. SÍNTESE DOS ANÁLOGOS DA CERULENINA.....	38
3.9.1 - Oxidação de Corey-Kim dos Álcoois Primários (Norioishi et al., 1979).....	39
3.9.2- Olefinação de Horner-Wadsworth-Emmons dos Aldeídos (Renard e Ghosez, 2001).....	38
3.9.3. Epoxidação dos Esteres Insaturados (Jakubowski. et al., 2001).....	39
3.9.4 – Preparação dos γ -Hidroxi- α,β -Alquinóico e Respectivas Lactonas (Yoda et al., 2011).....	39
3.9.5 – Preparação das Epóxi-Cetonas e Abertura das Lactonas (Furukawa, et al., 1988).....	40
3.9.6 – Preparação dos Compostos Dicarbonílicos (Mani, 1997).....	40
3.10. BIOENSAIOS.....	41
3.10.1. Teste de Toxicidade por Ingestão com <i>Atta Sexdens Rubropilosa</i>	41
3.11. ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	43
3.11.1. Acetilcolinesterase (Ache).....	43
3.11.2. Ácido Graxo Sintase.....	46
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	47
4.1. A GLÂNDULA METAPLEURAL.....	47
4.1.1. Histologia.....	47
4.1.2. Morfometria.....	50
4.1.3. Histoquímica.....	53
4.1.3.1. Detecção de Polissacarídeos.....	53
4.1.3.2. Detecção de Proteínas.....	53
4.1.3.3. Detecção de Lipídios Ácidos.....	54
4.1.3.4. Detecção de Lipídios Totais.....	54
4.1.4 Análises Químicas.....	61
4.1.4.1 CG-EM.....	61

4.1.4.2 Validação do Método.....	68
4.1.4.3. Resultados de RMN.....	80
4.1.5. Microorganismos Isolados e Ensaio Biológicos.....	82
4.2. A GLÂNDULA LABIAL.....	88
4.2.1 Histologia.....	88
4.2.2 Técnica Hematoxilina de Harris.....	89
4.2.3 Histoquímica.....	91
4.2.3.1 Detecção de Polissacarídeos.....	91
4.2.3.2 Detecção de Proteínas.....	91
4.2.3.3 Detecção de Lipídeos Ácidos.....	91
4.2.3.4 Detecção de Lipídeos Totais.....	92
4.2.4 Análises Químicas.....	100
4.2.5. Análise Histo-Enzimática.....	101
4.3. SÍNTESE DE ANÁLOGOS DA CERULENINA.....	108
4.4. BIOENSAIOS.....	118
4.4.1. Ensaio nas Formigas Cortadeiras.....	118
4.4.2. Ensaio Enzimáticos.....	121
4.4.3 Ensaio Fungicidas com <i>Leucoagaricus Gongylophorus</i>	123
5. CONCLUSÕES.....	125
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
7. APÊNDICES.....	139

1. INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 OS SUPERORGANISMOS

Ao estudar sobre os padrões de comunicação entre abelhas, o zoólogo austríaco Karl von Frisch, escreveu que:

“A natureza tem um tempo ilimitado para viajar por caminhos tortuosos rumo a destinos desconhecidos. A mente do homem é medíocre demais para discernir de onde vem e para onde vai o caminho, e tem de se contentar em conseguir enxergar apenas pedaços do caminho, por menores que eles sejam.”

As descobertas sobre o comportamento de uma grande sociedade biológica renderam à Frisch o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1973, (MICHELSEN, 2003).

Uma das melhores definições de sociedades foi fornecida por Edward O. Wilson, em 1975. Para o autor uma sociedade é um grupo de organismos pertencentes à mesma espécie e organizados de maneira cooperativa. No convívio social, custos e benefícios individuais são balanceados em função de necessidades e interesses compartilhados por todo o grupo. Diferentes graus de sociabilidade, que seriam as formas de integração entre organismos, já foram observados na natureza. O cenário mais complexo é encontrado nas chamadas *eussociedades*, ou sociedades verdadeiras, caracterizadas por uma divisão de trabalho que envolve a própria plenitude biológica dos organismos: a reprodução. O que remete a um termo recentemente empregado no estudo destas sociedades, os organismos multicelulares. Um organismo multicelular é constituído por células especializadas com funções distintas que coletivamente asseguram a sobrevivência e o êxito reprodutivo. Um dos modelos simples e biologicamente realistas mostra que as células podem estar dedicadas a funções que são importantes, seja para a sobrevivência ou para a reprodução. Usando o modelo, Gavrillets (2010) descobriu que a divisão de trabalho pode ocorrer em um curto período, dependendo da taxa de mutação, do número de células e de outros fatores. Os resultados teóricos podem também explicar além da origem dos órgãos o comportamento social de alguns insetos.

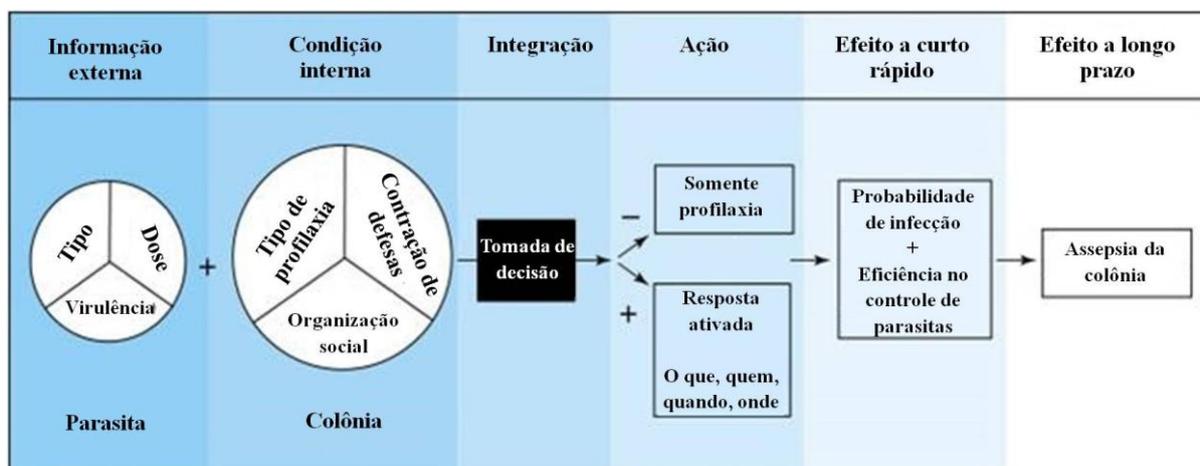
Apesar de ter sido retomada atualmente, esta analogia não é recente. Em 1911 Wheeler já demonstrava a semelhança entre colônias de insetos sociais e

organismos multicelulares, ao se referir à estas colônias como 'superorganismos'. Um século mais tarde, Strassman e Queller (2010) propuseram que uma entidade biológica pode ser definida como um organismo se houver cooperação alta e quase unânime entre suas partes constituintes, com conflitos reais entre as partes, em grande parte ausentes ou controladas. De acordo com este ponto de vista, os organismos podem ser vistos como grupo social altamente cooperativo, assim como as colônias de insetos eussociais (SEELEY 1995; FEWELL 2003). Os organismos multicelulares e sociedades de insetos enfrentaram os mesmos problemas de organização e intensa pressão da seleção de parasitas (WILSON, 1985; SEELEY 1997; HÖLLDOBLER e WILSON 2008) que levaram a uma série de analogias como anatomia e anatomia social, a fisiologia e fisiologia social, a imunidade e imunidade social (CREMER e SIXT 2009; JOHNSON e LINKSVAYER 2010).

1.2 IMUNIDADE SOCIAL

Como todos os animais, os insetos sociais apresentam defesas fisiológicas e imunológicas contra agentes de doenças (GILLESPIE et al, 1997;. SCHMID-HEMPEL 2005). No entanto, além da imunidade indivíduo, insetos sociais também mostram diversas adaptações da colônia à níveis fisiológicos, comportamentais e organizacionais. Insetos sociais apresentam defesas comportamentais coletivas que são alcançadas pela cooperação de todos os membros do grupo, evitando e eliminando coletivamente de infecções parasitárias (CREMER et al 2007;. & COTTER KILNER 2010). Todas essas defesas coletivas fazem parte da chamada imunidade social, um termo recentemente empregado por Cremer e colaboradores (2007). A idéia fundamental é que, agindo coletivamente, os indivíduos são capazes de montar uma defesa mais eficiente do que agindo individualmente. Muitos mecanismos diferentes podem contribuir para estas defesas imunitárias sociais: alguns são profiláticos, como a prevenção da transmissão de doenças pela prole ou pelas companheiras do ninho; outros são ativados pela necessidade da colônia uma vez que patógenos já estejam estabelecidos na colônia. Independente do caso em que ocorra um fator comum a todos estes mecanismos de defesa, é que estes são baseados em comportamentos altruístas ou ações coletivas que beneficiam

primeiramente a colônia, e não o indivíduo. Conseqüentemente, o sistema de imunidade social só pode ser compreendido como uma adaptação que ocorre ao nível da colônia (CREMER et al., 2007), FIGURA 1.1.



CREMER, 2007

FIGURA 1.1. Regulação da resposta imune social. A resposta de uma colônia de insetos sociais (grande círculo) a um parasita (pequeno círculo) deve levar em conta tanto a informação externa sobre o parasita (por exemplo, o seu tipo, dose e virulência) e informações internas sobre o estado da colônia. O estado colônia é determinado pela organização social dos membros da colônia, o grau de defesa profilática, e também por potenciais restrições sobre defesa anti-parasita, como o reconhecimento limitado ou capacidades de manipulação. Detalhes de como o processo de tomada de decisão ocorre (caixa preta) ainda não são compreendidas; o resultado é ou (-) ausência de ação, ou seja, a colônia se baseia exclusivamente em sua defesa profilático, ou (+) tomar medidas, ou seja, uma resposta ativa é acionada. No curto prazo, o resultado destas ações afetam o risco de infecção e eficiência de controle de parasitas da colônia, e, a longo prazo, na assepsia da colônia.

1.3. ESTRATÉGIAS SOCIAIS DE DEFESA:

1.3.1. COMPORTAMENTAL

Quando uma colônia de abelhas é infectada pelo fungo *Ascosphaera apis*, as operárias mantêm a temperatura dos ninhos elevada, pois desta forma impedem o desenvolvimento do fungo que é sensível ao calor. Esta defesa comportamental é conhecida como febre nas abelhas (STARKS, 2010) e ilustra de forma clara este mecanismo de defesa, onde o comportamento da colônia é alterado frente à um patógeno.

Formas extremas do comportamento altruísta são o suicídio adaptativo e a auto-remoção do membro da colônia, quando este apresenta algum tipo de enfermidade. Vários casos foram observados em insetos sociais. Muitas espécies de formigas operárias, quando contaminadas cessam o contato social. Há espécies que

deixam a colônia enquanto outras se isolam nas câmaras de lixo (HEINZE e WALTER 2010). Em abelhas, as operárias que apresentam alguma deformidade que comprometa a função desenvolvida, rastejam para fora da colméia (RUEPPELL et al. 2010). Os cupins sinalizam aos outros membros da colônia para se mantenham afastados dos indivíduos infectados, exibindo um comportamento de alarme vibratório (MYLES 2002, ROSENGAUS et al 1999).

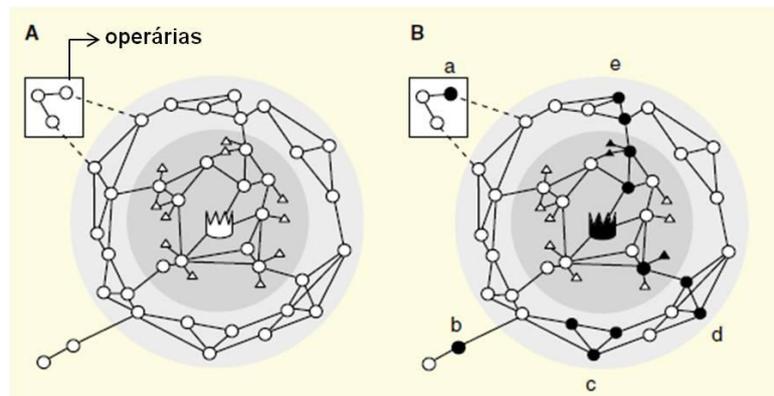
Outro comportamento muito comum entre insetos sociais, especialmente nas formigas é o *grooming*, Este tipo de comportamento é especializado na prevenção da proliferação de micróbios potencialmente prejudiciais (CURRIE e STUART, 2001). No comportamento de *grooming* detritos prejudiciais são filtrados por uma cavidade oral das formigas, a bolsa infrabucal. Todo material proveniente da limpeza das próprias formigas, áreas do ninho e jardim de fungo é acumulada nesta cavidade, comprimido e expelido na câmara de lixo (LITTLE et al., 2006).

1.3.2 IMUNIDADE ORGANIZACIONAL

Em 2007, Naug e Smith usaram a terminologia "imunidade organizacional" para descrever a forma com que a organização social dentro da colônia interage com as variáveis epidemiológicas. E desta forma podem criar diferentes níveis de transmissão de patógenos dentro de um grupo social. A heterogeneidade espacial e a natureza local das interações têm demonstrado efeitos determinantes sobre a transmissão e persistência de doenças (COMINS et al 1992;. KEELING, 2000).

A divisão de tarefas para formigas e abelhas, está intimamente relacionada com a casta e conseqüentemente o tamanho da operária. Assim, o polietismo etário corresponde a uma distribuição centrífuga das operárias no interior da colônia (BOURKE e FRANK 1995; JANDT e DORNHAUS 2009). Segundo esta dinâmica, a prole, as operárias mais jovens e a rainha estão espacialmente segregadas das operárias mais velhas (CAMAZINE 1991; SCHMID-HEMPEL e SCHMID-HEMPEL, 1993). A rainha, individuo vital para sobrevivência da colônia, é cercada e cuidada por operárias jovens, (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Já as operárias mais velhas estão envolvidas em atividades fora do ninho, como forrageamento e limpeza, FIGURA 1.2. A gestão de resíduos dentro da colônia, por exemplo, envolve estrita separação espacial de outras áreas do ninho. No caso de formigas cortadeiras, que

organizam a colônia diversas câmaras, aquelas que são voltadas para o lixo ficam distantes de onde o fungo simbiote é cultivado (Bot et al., 2001).



CREMER, 2007

FIGURA 1.2. Polietismo etário na distribuição centrífuga. **(A)** Operárias de mesma casta e idade realizam funções semelhantes (círculos cinza), sendo que as mais jovens e rainha (representada pela coroa) e a prole (representada pelos triângulos) estão mais ao centro da colônia, enquanto as operarias adultas realizam funções nas extremidades e fora do ninho. **(B)** Na presença de um agente patogênico (círculo preto), onde não há contaminação da colônia.

1.3.3 QUÍMICA

Uma das primeiras defesas coletivas em colônias de insetos sociais consiste no uso de compostos com atividade antimicrobiana. Estes podem ser liberados por glândulas exócrinas dos próprios indivíduos, ou recolhidos a partir do ambiente (SADD e SCHMID-HEMPEL 2006). Formigas e abelhas, muitas vezes, usam resinas que tem propriedade antimicrobiana. Um exemplo ocorre com a espécie *Formica paralugubris*, que coletam resina solidificada de árvores coníferas (CHRISTE et al. 2003). Em abelhas melíferas, o uso do própolis é muito comum (SIMONE et al., 2009). Nos insetos sociais, a complexidade do estilo de vida foi acompanhada pela evolução dos compostos antimicrobianos. Uma vez que uma maior eficácia tornou-se necessária em função número de indivíduos de uma mesma colônia (STOW et al 2007; TURNBULL et al 2010, HOGGARD et al., 2011). Nos cupins, os soldados secretam compostos antimicrobianos a partir de suas fezes ou das glândulas frontais (CHEN et al, 1998; ROSENGAUS et al 2000). A glândula de veneno de várias formigas, vespas e abelhas produzem compostos com atividade antimicrobiana que representa uma das mais importantes na ordem Hymenoptera (Kuhn-Nentwig 2003). Obin e Vander Meer (1985) demonstraram que formigas lava-pé *Solenopsis (fire*

ants), liberam pequenas quantidades de veneno na superfície da prole a fim de manter a assepsia. Nas vespas *Polistes dominulus*, peptídeos liberados pela glândula de veneno apresentam forte atividade antimicrobiana (TURILLAZZI et al. 2006). Em formigas, a glândula metapleurálica produz secreções com atividade antisséptica e antifúngica (HÖLLDOBLER & WILSON 1990), esta será abordada mais detalhadamente a seguir.

1.4. ESTRATÉGIAS DE DEFESA EM FORMIGAS

Muitas espécies de formigas constroem seus ninhos no solo, ambiente rico em microorganismos como: fungos, microorganismos eucarióticos, bactérias e vírus, que podem contaminar as colônias (SCHMID-HEMPEL, 1998). Além das defesas sociais, existem defesas individuais que atuam em conjunto com as primeiras conferindo à colônia condições assépticas, FIGURA 1.3 (SCHLÜNS e. CROZIER, 2009).

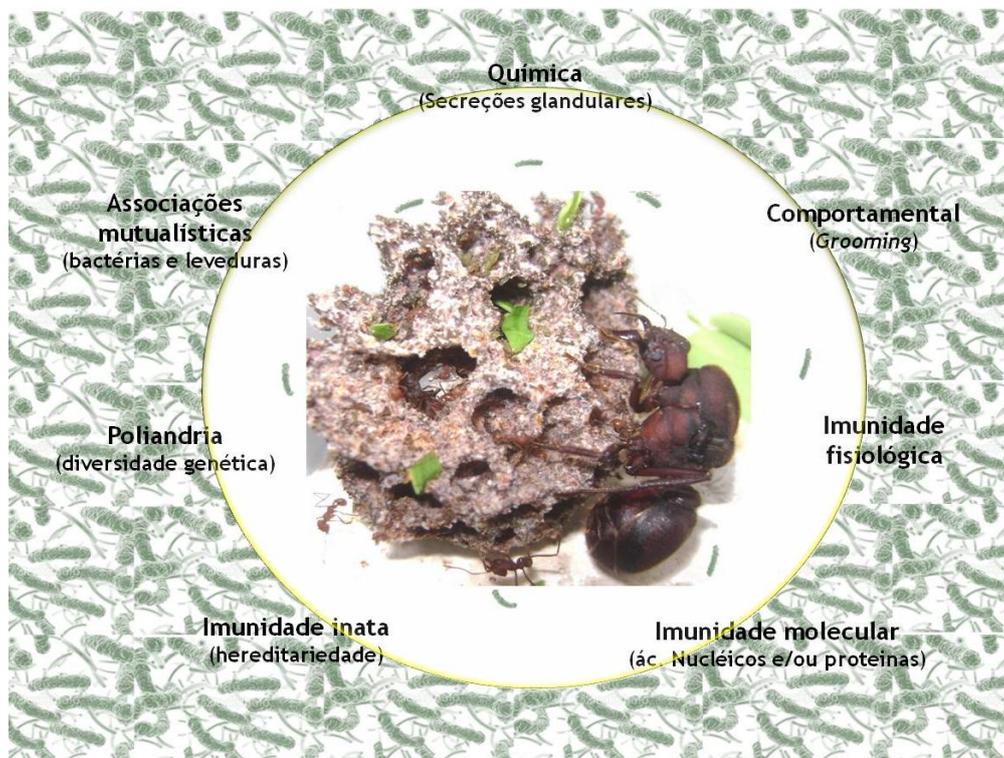


FIGURA 1.3. Tipos de defesas imunes a nível social e individual presentes em colônias de formigas.

As defesas sociais já foram anteriormente descritas. Com relação às defesas individuais temos:

1.4.1 IMUNIDADE INATA

A imunidade inata atua no reconhecimento de estruturas que são compartilhadas por uma classe de microorganismos, ou seja, se ligam especificamente aos padrões moleculares associados a determinados patógenos, como lipopolissacarídeos e peptidoglicanos. Este tipo de defesa para formigas ainda não foi bem evidenciado, pois uma sequência inteira do DNA de nenhuma espécie foi expressa até o momento. Contudo a mosca *Drosophila melanogaster* constitui uma das espécies mais estudadas para este tipo de defesa e pode ser dada como exemplo. A mosca da fruta apresenta receptores do tipo *Toll*, que são os responsáveis pela imunidade inata. O *Toll* por si só não é um receptor de reconhecimento padrão, pois depende de algumas famílias de proteínas para ser ativado. Uma das famílias de sensores patogênicos compreende as proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRPs). A *Drosophila* possui 13 genes de PGRP codificando proteínas que ligam os componentes de peptídeos das paredes celulares bacterianas. Estas PGRPs podem proporcionar a morte de micróbios diretamente através da fagocitose (HOFFMANN e REICHART, 2002). A espécie mais próxima às formigas estudada é a *Apis mellifera*. Evans e colaboradores (2006) demonstraram que há um pequeno número de genes de reconhecimento nas abelhas.

1.4.2. IMUNIDADE MOLECULAR:

Está relacionada ao combate de patógenos pelo uso de ácidos nucleicos ou proteínas, a nível celular. Assim como no caso anterior a falta de uma sequência completa do genoma dificulta o estudo claro desta forma de defesa. Em 2008, Viljakainen clonou e sequenciou alguns genes: o peptidoglicano de reconhecimento (PGRP-SC2) e uma proteína de ligação de bactérias Gram-Negativa (GNBP1) de *Myrmica ruginodis*. Enquanto de *Formica aquilonia* a proteína de reconhecimento do peptidoglicano (PGRP -SA). A função destes genes não está bem estabelecida em formigas, mas em *Drosophila melanogaster*, já é sabido que estes apresentam função no reconhecimento de infecções bacterianas (LEMAITRE e HOFF-MANN, 2007).

1.4.3. POLIANDRIA:

A casta reprodutora nas colônias é formada por um número restrito de indivíduos. Muitas apresentam apenas uma rainha, sendo assim todas as operárias são filhas de uma única rainha (espécies monogínicas). As formigas cortadeiras do gênero *Atta* são poliândricas, ou seja, copulam com mais de um macho (FJERDINGSTAD e BOSSMSMA, 2000). Muitos autores apontam esta prática como sendo benéfica para a colônia, pois garante a diversidade genética. Desta forma os indivíduos com reduzido grau de parentesco seriam mais resistentes a adversidades (PALMER e OLDROY, 2000; HUGHES e BOOMSMA, 2004). A poliandria ainda pode ser maléfica à rainha, como mostrado por Baer e colaboradores (2006). Segundo os autores, quando rainhas de *Atta colombica* apresentavam mais espermatozoides em sua espermateca o percentual de mortalidade era maior, se comparado com aquelas que apresentavam menos espermatozoides. Assim, a poliandria acarretaria em um custo devido à redução da imunidade com o acasalamento múltiplo.

1.4.4. ASSOCIAÇÕES

A relação mutualística entre formigas cortadeiras e o fungo simbiote que persiste por milhões de anos, é um fator que torna a colônia ainda mais suscetível às contaminações (CURRIE et al., 2006). As formigas impedem a reprodução sexuada do fungo que não forma corpos de frutificação, já que este não é usado como alimento. A disseminação da espécie ocorre quando as novas rainhas, fertilizadas, levam micélios deste para fundar uma nova colônia (MUELLER et al., 2005). Se por um lado o fungo não pode se reproduzir sem as formigas, por outro elas não teriam alimento suficiente para suprir as necessidades da colônia sem o fungo. Nos ninhos não são encontrados apenas as formigas e o fungo simbiote. Na verdade há um sistema complexo, com vários microorganismos envolvidos, incluindo mutualistas (CURRIE et al., 1999a) e parasitas (CURRIE et al., 1999b), FIGURA 1.4.

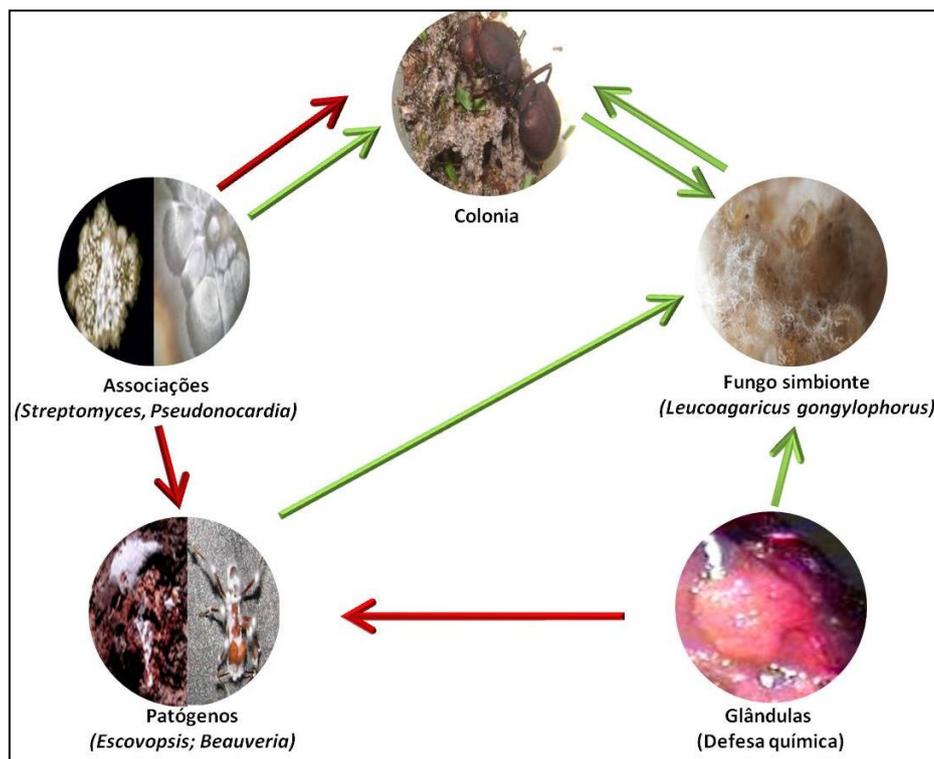


FIGURA 1.4 - Simbiose existente entre formigas e seus jardins de fungo. Atualmente são caracterizados cinco indivíduos nesta interação: as formigas cultivadoras de fungo da tribo Attini; o fungo simbiote; o fungo entomopatogênico *Escovopsis*; bactérias do gênero *Pseudonocardia*; leveduras negras.

Formigas cortadeiras cultivam somente uma variedade de fungo nas colônias (MUELLER et al., 2005). No entanto, esta monocultura tem a desvantagem de deixá-las particularmente mais propensas ao ataque de parasitas. Isto se torna ainda mais evidente quando analisamos outros fatores que estão relacionados à vida social. Dentre estes, destacam-se o elevado número de indivíduos dentro dos ninhos, proximidade genética entre os indivíduos, o espaço limitado dos ninhos e o calor metabólico que mantêm uma temperatura ideal para crescimento de muitos agentes patogênicos (FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2006). A relação simbiote entre formiga/fungo é frequentemente perturbada pelo parasita especializado *Escovopsis* sp. Esta espécie pode subsistir nos jardins cultivados pelas formigas reduzindo os nutrientes disponíveis ao ponto de levar a colônia à morte (HAEDER et al., 2009).

Em 1972, Weber observou que as cutículas de espécies de *Acromyrmex* eram cobertas por um tipo de “cera”. Foi somente em 1999 que Currie e colaboradores descobriram que actinobactérias do gênero *Pseudonocardia* colonizavam a cutícula da formiga *Acromyrmex octospinosus*. Esta bactéria

filamentosa produz antibióticos principalmente contra o fungo do gênero *Escovopsis* (CURRIE *et al.*, 1999a). A natureza química do composto responsável pela atividade antifúngica sobre *Escovopsis* foi recentemente revelada (HAEDER *et al.*, 2009). A candicidina D, FIGURA 1.5, apesar de ser altamente eficiente contra *Escovopsis*, não afeta o crescimento do fungo simbiote. Mostrando que o composto constitui uma importante forma de proteção para o cultivar das formigas.

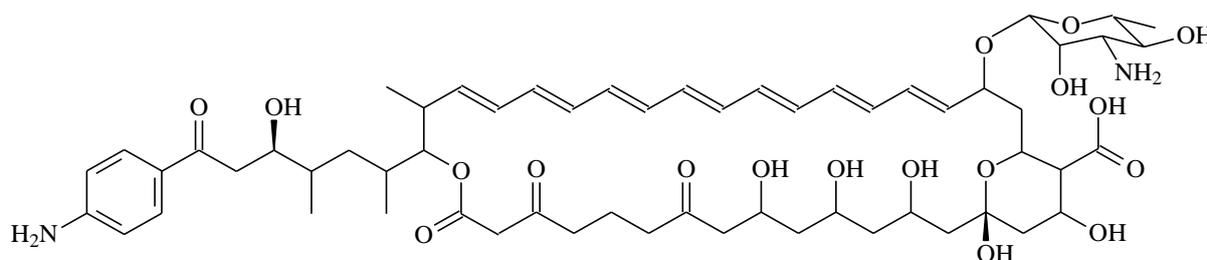


FIGURA 1.5 – Estrutura do Candicina D .

Uma revisão publicada em 2009 por Sen e colaboradores coloca em dúvida a associação simbiote entre *Pseudonocardia* e formiga cortadeira. O estudo mostra que os antibióticos produzidos pela bactéria não são específicos e o uso indiscriminado destes poderia até ser prejudicial ao fungo cultivado. Os autores sugerem ainda que, o fato de alguns destes antibióticos apresentarem atividade contra *Escovopsis* seja algo meramente fortuito, decorrente da verdadeira função de bactérias *Pseudonocardia* que ainda seria desconhecida nos ninhos de formigas cortadeiras.

Outro constituinte desta relação simbiote na tribo Attini são leveduras negras, pertencentes ao filo Ascomycota e ao gênero *Phialophora* (LITTLE e CURRIE, 2007). Alguns gêneros são frequentemente encontrados nos ninhos de formigas cortadeiras (CARREIRO *et al.*, 1997; MIDDELHOVEN *et al.*, 2003; PAGNOCCA *et al.*, 2008 e LITTLE e CURRIE, 2008). O papel das leveduras nos ninhos ainda não é muito claro. Elas podem estar atuando no processo digestivo gerando compostos, derivados do substrato vegetal, mais assimiláveis por meio de processos enzimáticos (RODRIGUES *et al.*, 2009). Para espécies de *Atta* esta associação altamente vantajosa já que bactérias do gênero *Pseudonocardia* são raramente encontradas nos ninhos (CURRIE *et al.*, 1999b e MUELLER *et al.*, 2008). No entanto, a relação com leveduras negras pode ter efeito negativo. Podendo reduzir a

habilidade da bactéria do gênero *Pseudonocardia* de suprimir o parasita *Escovopsis* sp. adquirindo nutrientes da bactéria, já que crescem no mesmo local da cutícula onde estas estão associadas à formiga (LITTLE e CURRIE 2007), FIGURA 1.6.



LITTE e CORRIE, 2007

FIGURA 1.6- Levedura negra associada às formigas cultivadoras de fungo. (a) colônia de levedura negra crescendo em Agar; (b) formiga e fungo de onde a levedura negra foi isolada, *Apterostigma pilosum*; (c) levedura negra crescendo no tórax da formiga.

A produção e utilização de antibióticos que atuam mantendo a assepsia das colônias de formigas cortadeiras pela interação com outros microorganismos não são muito claras. A presença de microorganismos como de bactéria e leveduras é muito variável, dependente de fatores tais como: espécie, tipo de solo e localização. Sendo assim é fundamental conhecer mecanismos de defesa constantes. Formigas cortadeiras utilizam a defesa química contra patógenos por meio de secreção glandular (ATTYGALLE et al., 1989; NASCIMENTO et al., 1996 e HUGHES et al., 2002). Esta defesa envolve a secreção de compostos com atividade antimicrobiana excretados principalmente pela glândula metapleural, que é constituída por um par de células secretoras localizadas na região posterolateral do tórax. Esta glândula ocorre somente em formigas e apresenta uma estrutura morfológica básica para a maioria das espécies (HÖLLDOBLER e ENGEL-SIEGEL, 1984).

1.4.5. DEFESA QUÍMICA EM FORMIGAS CORTADEIRAS

Retomando a defesa química, a forma com que as formigas usam os antibióticos secretados pela glândula metapleural não foi bem evidenciada. Alguns autores admitem que as formigas não controlam a secreção que é frequentemente liberada pelo orifício de saída, revestindo a cutícula das formigas. Assim, se forma

uma camada protetora que é espalhada durante o *grooming* social. (NORTH et al., 1997). Outros acreditam que esta abertura seja estimulada frente a uma contaminação (BOT et al., 2002). Fernández-Marín e colaboradores (2006) descrevem um comportamento específico para o *grooming* da glândula metapleurale. Segundo os autores, inicialmente a operária passa as pernas dianteiras especificamente acima do orifício de abertura da glândula e, em seguida, passa as pernas dianteiras na glossa.

Os primeiros trabalhos que estudaram os constituintes da glândula metapleurale de formigas cortadeiras foram publicados independentemente na década de 70 por Maschwitz e colaboradores (1970), e Schildknecht e Koob (1971). As análises químicas das glândulas das espécies *Atta sexdens* e *Atta sexdens rubropilosa* apresentaram os ácidos fenilacético, β -hidroxiácidos, como o 3-hidroxi-decanoico e 3-indolacético como principais constituintes. Em 1976, Schildknecht identificou outros dois compostos presentes na secreção da glândula metapleurale de *A. sexdens rubropilosa*, que são os ácidos 3-hidroxi-hexanoico, 3-hidroxi-octanoico. Em 1994, Jaffé relacionou a secreção da glândula metapleurale de *Acromyrmex landolti* e *Atta leavigata*, composta principalmente pelo ácido palmítico, à atividade antimicrobiana.

Nascimento et al., (1996) identificou os ácidos fenilacético, 3-hidroxi-dodecanoico e indol acético na glândula de *Atta cephalotes* e os ácidos 3-hidroxi-decanoico e indol acético em *Acromyrmex octospinosus*. Neste mesmo trabalho, os autores confirmam a atividade antibacteriana e antifúngica dos principais constituintes da glândula metapleurale destas espécies.

Em 2000, Ortius-Lechner e colaboradores identificaram mais 20 compostos presentes na secreção da glândula metapleurale de *Acromyrmex octospinosus*. A maioria das substâncias são ácidos de cadeia curta como os ácidos acético, hexanoico, heptanoico; de cadeia longa como ácido tetradecanoico, pentadecanoico e palmítico e também cetoácidos como ácido 4-oxooctanoico e 4-oxodecanoico. Os autores testaram os ácidos fenilacético, indol acético, hexanoico e octanoico contra os agentes patogênicos humanos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. A maior parte dos compostos apresentou atividade antimicrobiana.

O tamanho da glândula metapleural é uma importante característica funcional desta glândula. Em um trabalho publicado por Angsum e colaboradores em 1993 a hipótese levantada para explicar esta diferença de tamanho é que operárias maiores têm uma superfície cuticular maior. Desta forma necessitariam de maior proporção individual de secreção antibiótica, logo estas operárias possuem glândulas maiores. No entanto, em espécies de *Atta* e *Acromyrmex* operárias menores apresentam maior reservatório da glândula metapleural se comparadas às maiores (BOT et al., 2001, 2002 e DE SOUZA et al., 2006), sugerindo que a maior proporção de substâncias com atividade antimicrobiana nas operárias mínimas é necessária, pois estas são responsáveis pelo cultivo do fungo simbiote e cuidado com a prole.

Trabalhos recentes mostram que as operárias mínimas são mais resistentes à contaminação com os fungos *Metarhizium anisopliae* (HUGHES et al., 2002) e *Aspergillus nomius* (POLSEN et al., 2006). No caso de *A. nomius* tal fato só é observado se as operárias forem tratadas com uma dose de inóculo correspondente ao seu tamanho. Já *M. anisopliae* as mínimas apresentam maior resistência mesmo tratadas com doses iguais as aplicadas em maiores operárias.

Além da defesa química as formigas também apresentam defesas comportamentais como o *grooming*. Comportamento especializado na prevenção da proliferação de micróbios potencialmente prejudiciais aos jardins de fungo (CURRIE e STUART, 2001). No comportamento de *grooming* detritos prejudiciais, incluindo esporos de patógenos como *Escovopsis sp.*, são filtrados por uma cavidade oral das formigas, a bolsa infrabucal. Todo material proveniente da limpeza das próprias formigas, áreas do ninho e jardim de fungo é acumulada nesta cavidade, comprimido e expelido na câmara de lixo (LITTLE et al., 2006).

1.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS À IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE SEMIOQUÍMICOS

Atualmente há um grande número de técnicas e métodos que podem ser empregados na extração e identificação de semioquímicos (JONES e OLDHAM, 1999). A metodologia mais apropriada depende do tipo de material em estudo e disponibilidade de equipamentos adequados (FERREIRA et al., 2001). A identificação dos voláteis extraídos é feita, principalmente, com o uso da cromatografia gasosa aliada à espectroscopia de massas (CG-EM). Por este método

é possível separar uma mistura multicomponente proveniente de um extrato natural. A separação está relacionada com as características físico-químicas de cada substância. Os fragmentos gerados na CG-EM fornecem informações características da substância que são muito úteis na identificação da maioria dos voláteis (ZARBIM et al., 1999 e FERREIRA et al., 2001). A principal limitação da CG-EM é o fato de ser aplicada apenas a moléculas relativamente voláteis e termicamente estáveis (COLLINS, 1997).

Dentro deste contexto, no presente trabalho, além da técnica analítica CG-EM os extratos glandulares também foram submetidos à espectroscopia de massas com ionização por electrospray. Esta técnica vem sendo amplamente utilizada na determinação do peso molecular, assim como, na elucidação estrutural de substâncias polares e pouco voláteis em fase líquida (CROTTI, 2006), característica principal da maioria dos compostos envolvidos em processos bioquímicos.

De forma geral, um espectrômetro de massas é um instrumento que contém basicamente um injetor de amostra, uma fonte de íons, um separador ou filtro de massa/carga (m/z) e um detector. Como o tipo de amostra analisada é muito variável, as estratégias de separação são diversas, sendo que o tipo de ionização da amostra é o que possui o maior número delas. Existem vários tipos de geradores de íons aplicados à espectrometria de massas, entre eles: Ionização por Elétrons (EI), Ionização Química (CI), Bombardeamento rápido de átomos (FAB), Ionização por Dessorção a Laser Assistida pela Matriz (MALDI), Dessorção/Ionização sobre Silicó (DIOS), Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) e Ionização por *Electrospray* (ESI) (CROTTI, 2006).

1.7 CONTROLE DE INSETOS POR INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

No estudo desenvolvido por López e Bolaños em 2011, fica claro que existem várias maneiras de se levar um inseto a morte por intoxicação. Tais modos de ação são baseados no fato de que as células dos seres vivos serem semelhantes do ponto de vista funcional. Diversas substâncias atuam em diferentes estágios do ciclo de vida do inseto. Em 2001 trabalhos publicados separadamente por Ecobichon (2001), e Gregus e Klaassen (2001), evidenciaram sete mecanismos de ação. Um deles diz respeito à ação em enzimas específicas onde as substâncias podem reagir com a enzima ou uma proteína de transporte e inibir sua função normal e dentre as

enzimas citadas uma em especial é a acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima está amplamente distribuída em todas as membranas excitáveis de todo o reino animal. Esta enzima atua nas sinapses neurais para rapidamente hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina para acetato e colina. Quando a AChE é inibida, a acetilcolina é acumulada, o nervo permanece polarizado e há uma superestimulação nas junções neuromusculares. A enzima AChE encontra-se principalmente no sistema nervoso central dos insetos, enquanto que nos mamíferos é encontrada em ambos os sistemas nervosos, central e periférico. Desta forma, a diferenças nos sintomas de envenenamento por anticolinesterásicos entre os dois grupos é significativa. A reação entre acetilcolina e a enzima AChE acontece em três etapas, como mostrado na FIGURA 1.7. A formação do complexo de Michaelis entre o substrato acetilcolina e AChE é (1); (2) é a acetilação da enzima e formação de colina; (3) a hidrólise da enzima acetilada para dar enzima livre e ácido acético. Estas reações ocorrem rapidamente, por isso, não há acumulação de acetilcolina na sinapse.

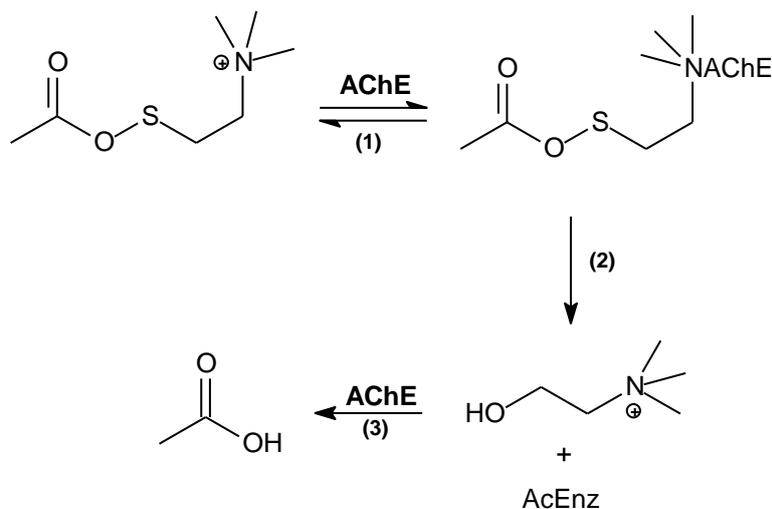
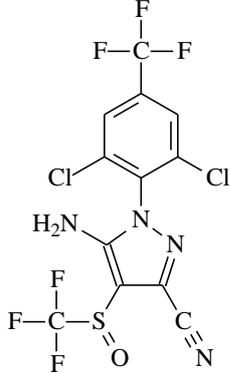
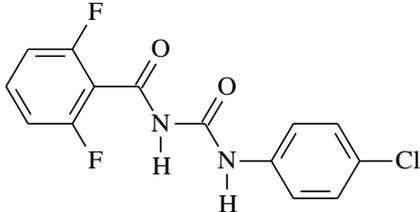
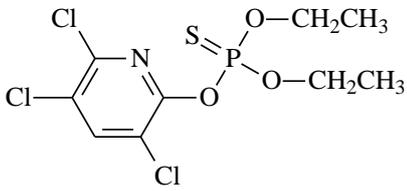
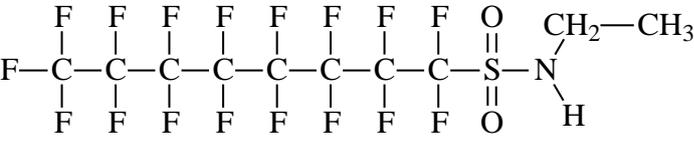


FIGURA 1.7- Esquema do mecanismo de hidrólise da enzima AChE.

A maioria das attines utiliza material vegetal e animal em decomposição como substrato para o desenvolvimento do fungo simbiote. Somente as formigas cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* usam folhas frescas para o cultivo do fungo (WEBER, 1972). Motivo pelo qual se confere o *status* de praga a estas formigas.

Empresas de reflorestamento têm empregado o controle químico de formigas cortadeiras de forma sistemática através de iscas tóxicas granuladas. Estima-se que no Brasil são usadas aproximadamente 12.000 toneladas-ano de iscas tóxicas no combate de formigas cortadeiras (BOARETTO e FORTI, 1997). Na TABELA 1.1 são mostrados os princípios ativos das principais iscas disponíveis no mercado, bem como o modo de ação destas.

TABELA 1.1 - Iscas tóxicas granuladas existentes no mercado: grupo químico a que pertencem, estrutura do princípio ativo, marca comercial, e modo de ação sobre formigas cortadeiras

Grupo químico	Nome Químico	Marca comercial	Modo de ação
Fenilpirazol (Fipronil)		Blitz	Sistema GABA (ácido gama-aminobutírico)
Benzoil-uréia (Diflubenzuron)		Formilin 400	Provavelmente na biossíntese de Quitina
Fosforado (Clorpirifós)		Pyrinex; Pik-isca Pikapau; Attafós; KI-Isca - Nitrosin Landrin; Urutu-Ag; Tatu Formifós; Iskatoks	Transmissão sináptica
Sulfonas Fluoralifáticas (Sulfluramida)		Mirex-S; Attamex-S; Pikapau-S; Tamanduá Bandeira-S; Dinagro-S; Agripec. Fluramin.	Fosforilação oxidativa

FONTE: BOARETTO e FORTI, 1997

O controle químico é feito principalmente com iscas à base de sulfluramida. Estas estão no grupo dos PFOS (perfluorooctane sulfonate). Em 2005 o governo sueco solicitou que os PFOS entrassem na convenção de Estocolmo para o anexo

A, ou seja, substâncias que teriam o uso eliminado. A substância foi analisada pelo comitê do ponto de vista físico-químico, onde foi comprovado que esta era poluente orgânico.

Neste contexto, a busca por novas moléculas, como os inibidores enzimáticos é uma forma promissora e de extrema importância no controle de insetos sociais.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo na primeira etapa investigar a química, morfo-histologia e a histoquímica dos componentes glandulares (células, ductos, câmara coletora, reservatório e secreção) da glândula metapleural e labial dos indivíduos das diferentes castas operárias espécies de formigas cortadeiras: *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta bisphaerica*, *Acromyrmex rugosus*, *Acromyrmex balzanii*, *Trachymyrmex fuscus*, visto que as castas apresentam tamanhos e atividades diferenciadas nos ninhos, todas serão analisadas.

Na segunda etapa do trabalho, realizar a síntese de compostos com potencial atividade inibitória de duas enzimas que podem auxiliar no controle deste inseto praga, através da ação sobre AChE e ácido graxo sintase.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Na descrição dos materiais e métodos a seguir, quando não for especificado, procedeu-se da mesma forma para as cinco espécies analisadas *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta bisphaerica*, *Acromyrmex rugosus*, *Acromyrmex balzanii*, *Trachimyrmex fuscus*.

3.1. EQUIPAMENTOS

3.1.1. ESPECTRÔMETROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC, NOESY foram realizadas nos seguintes aparelhos: BRUKER modelo DRX 400 (9,4 Tesla); BRUKER modelo ARX 200 (4,7 Tesla); AVANCE III 400 NANO (9,4 Tesla); BRUKER 600 (14,1 Tesla) com Crio Sonda Inversa (CTCI).

3.1.2. ESPECTROFOTÔMETRO DE ULTRAVIOLETA (UV)

8453 UV/Visible Spectrophotometer, G1103A, Agilent Technologies.

3.1.3. CROMATÓGRAFO DE CLAE

SHIMADZU SCL-10AV (condições analíticas e preparativas com válvula de reciclo) E “loop” de 200 μL com detector UV-Vis Shimadzu SPD-10AV;

3.1.4. ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

GC-EM Shimadzu QP 5000-ionização por impacto eletrônico- DQ/UFSCar. Sistema LC/MS/MS, modelo API 2000, Applied Biosystems (AB Sciex), munido de um triplo quadrupolo (QqQ). Fontes de ionização: ESI Turbo Ion Spray, APCI e software Analyst. MICROMASS Quattro LC (triplo quadrupolo) equipado com uma fonte ESI/APCI “Z-spray” e gás de arraste argônio, utilizado em LC acoplado ao cromatógrafo líquido WATERS Alliance 2695-LaBioMMi- DQ/UFSCar.

3.1.5. ESPECTRÔMETRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO

Bruker Daltonics, Billerica, EUA; modelo UltrOTOFG - ESI-TOF, modo de detecção positivo e negativo. FCFRP-USP-Ribeirão Preto.

3.1.6. ESPECTROFOTÔMETRO DE INFRAVERMELHO (IV)

BOMEM (BM-Séries Aridzone), utilizando placas de KBr.

3.1.7. ELETROFORESE CAPILAR

P/ACE MDQ Beckman Coulter

3.1.8. ROTA-EVAPORADORES

BUCHI, rotavapor R-114, equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C; BUCHI, rotavapor R-200, equipado com banho BUCHI 490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C.

3.2. MATERIAIS PARA CROMATOGRAFIAS

3.2.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA (CCDC)

Fases estacionárias para cromatografia em camada delgada: Sílica gel 60 GF₂₅₄ MERCK em placas de vidro preparadas no laboratório, de dimensões 3 x 10 cm (0,25 mm espessura). Sílica gel 60 GF₂₅₄ MERCK em placas de alumínio.

3.2.2. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA (CCDP)

Sílica gel 60 PF₂₅₄ (70 – 230 Mesh ASTM) em placas de vidro preparadas no laboratório, de dimensões 20 x 20 cm e 1 mm espessura.

3.2.3. COLUNAS PARA CLAE

Coluna Gemini C-18 (fase de sílica modificada com octadecilsilano), analítica (10 µm; 25,0 x 0,46 cm) e preparativa (10 µm; 31,0 x 1,0cm). Coluna Phenomenex – Luna fenil-hexil, analítica (10 µm; 25,0 x 0,46 cm) e preparativa (10 µm; 30,0 x 0,8 cm).

3.2.4. FASES ESTACIONÁRIAS

Sílica 60 (230 – 400 Mesh ASTM) – “flash”.

Sílica 60 (70 – 230 Mesh ASTM) – “comum”.

Sephadex[®] LH – 20 (dextrana hidroxipropilada – Amersham Pharmacia Biotech).

Florisil (230 – 400 Mesh ASTM).

3.2.5. COLUNAS CROMATOGRÁFICAS DE BANCADAS DE VIDRO

As colunas utilizadas nas análises por CC foram confeccionadas na vidraria do DQ – UFSCar.

3.2.6. SOLVENTES PARA CROMATOGRAFIA

BRENTAG e outros destilados na sala de destilação do Departamento de Química da UFSCar para obtenção de extratos e fracionamento dos mesmos; Solventes grau HPLC, TEDIA e J.T. BACKER.

3.2.7. SOLVENTES PARA OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN

Solventes deuterados (ACROS organics; CIL Cambridge Isotope Laboratories, Inc. e ALDRICH Chemical Company, Inc.).

3.2.8. REVELADORES PARA CCD

Câmara de luz ($\lambda = 254 \text{ nm}$ e 365 nm);

Solução de Vanilina acidificada

Cloreto férrico (solução etanólica a 3%)

Vapor de amônia.

3.3. REAGENTES

Os reagentes utilizados foram adquiridos pela Sigma Aldrich.

3.4. FORMIGAS

As formigas foram obtidas da colônia mantida em condições naturais no Centro de Estudos de Insetos Sociais – CEIS/UNESP, campus de Rio Claro – SP, Brasil.

As formigas tiveram suas pernas e cabeças removidas, em placas de Petri, com auxílio de estereomicroscópio ZEISS, por meio de pinças de ponta fina e de microtesoura cirúrgica, restando apenas os mesossomas, os quais continham as glândulas metapleurais e labiais. A parte posterior de cada mesossoma foi seccionada para extração da glândula metapleural e a parte anterior para a glândula labial (Figura 3.1). Na sequência, as glândulas foram fixadas em fixadores específicos de acordo com cada técnica a ser empregada.

As formigas tiveram suas pernas e cabeças removidas, em placas de Petri, com auxílio de estereomicroscópio ZEISS, por meio de pinças de ponta fina e de microtesoura cirúrgica, restando apenas o mesossoma o qual continham as glândulas metapleurais e labiais. A parte posterior do mesmo foi seccionada para extração da glândula metapleural e a parte anterior para a glândula labial, FIGURA 3.1. Na sequência as glândulas foram fixadas em fixadores específicos de acordo com cada técnica a ser empregada.



FIGURA 3.1. Representação esquemática da extração para *Atta sexdens rubropilosa*; tórax 5x, glândula metapleural 20x, glândula labial 10x.

3.4.1. MORFOMETRIA

Todas operárias foram submetidas à análises morfométricas pela medição da cabeça. No caso da glândula metapleural o mesmo foi feito para o reservatório. Também para esta glândula, os dados obtidos foram plotados no programa origin e realizados teste de correlação de Person, a nível de significância de 0.01, entre comprimento da cabeça e diâmetro do reservatório, a fim de verificar a proporcionalidade entre reservatório e tamanho do corpo das operárias.

3.4.2. TÉCNICA DA HEMATOXILINA DE HARRIS – EOSINA AQUOSA (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA 1983)

Dez glândulas labiais e dez metapleurais de cada casta, com relação às espécies *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta bisphaerica*, *Acromyrmex balzanii* e *Acromyrmex rugosus* e de *Trachymyrmex fuscus*, depois de retiradas foram fixadas em solução contendo paraformaldeído 4% durante 24 horas. Após este período, o material foi desidratado em soluções crescentes de etanol a 70, 80, 90 e 95%, durante 20 minutos cada banho. Em seguida, o material foi transferido para resina durante 48 horas, e então transferido para moldes plásticos, previamente preenchidos com resina e endurecedor. Os moldes foram colocados em estufa por

24 h à 37 °C. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com 3 µm com auxílio de micrótomo Leica HM 360, os cortes foram hidratados e recolhidos em lâminas de vidro. Depois de secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina por 15 min e eosina (HE) por 5 min. As lâminas foram secas em estufa por 12 h à 37 °C e posteriormente cobertas com verniz vítreo e lamínula conforme rotina histológica, para observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio Olympus BX51 acoplado ao computador Intel Pentium 4.

3.5 ANÁLISES HISTOQUÍMICAS

3.5.1. TÉCNICA DO AZUL DE BROMOFENOL PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS (PEARSE, 1985)

Dez glândulas metapleurais e dez labiais de cada casta das espécies estudadas, e foram removidas e fixadas em paraformaldeído 4% e NaCl 0.9% em tampão fosfato 10% (0.1 M – pH 7.4) por 24 h. Em seguida, o material foi transferido para resina durante 48 h, e então transferido para moldes plásticos, previamente preenchidos com resina e endurecedor. Os moldes foram colocados em estufa por 24 h à 37 °C. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com 3 µm com auxílio de micrótomo Leica HM 360, os cortes foram hidratados e recolhidos em lâminas de vidro. Após a secagem das lâminas, estas foram coradas com solução de azul de bromofenol durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram banhadas em solução aquosa de ácido acético 0.5%, durante 5 minutos e passadas no álcool butílico terciário por 5 minutos. Depois as lâminas foram diafanizadas em xilol e montadas em verniz vítreo para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio Olympus BX51 acoplado ao computador Intel Pentium 4.

3.5.2. TÉCNICA DO PAS/ALCIAN BLUE PARA DETECÇÃO DE POLISSACARÍDEOS (GLICOPROTEÍNAS) COM GRUPAMENTOS 1-2 GLICOL E POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983)

Dez glândulas metapleurais e dez labiais de cada casta das espécies em estudo foram removidas e fixadas em mistura aquosa de Bouin por 24 h. Em seguida, o material foi transferido para resina durante 48 h e então transferido para moldes plásticos previamente preenchidos com resina e endurecedor. Os moldes foram colocados em estufa por 24 h à 37 °C. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com 3 µm com auxílio de micrótomo Leica HM 360, os cortes foram hidratados e recolhidos em lâminas de vidro. Após secas, as lâminas foram coradas com alcian blue, pH 2.5 durante 30 min e em seguida, lavadas em água destilada e passadas em ácido periódico 1%, durante 5 min e passadas novamente na água destilada. Posteriormente, as secções foram submetidas ao reativo de Schiff por 30 min, lavadas em água sulfurosa durante 1 min e lavadas novamente em água corrente durante 10 min. A seguir, foram contracoradas com hematoxilina de Harris durante 2 min para evidenciação dos núcleos celulares e, em seguida, lavadas em água corrente. Depois as lâminas foram diafanizadas em xilol e montadas em verniz vítreo para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio Olympus BX51 acoplado ao computador Intel Pentium 4.

3.5.3. TÉCNICA DO AZUL DE NILO PARA DETECÇÃO DE LIPÍDIOS ÁCIDOS (LISON, 1960)

Dez glândulas metapleurais e dez labiais de cada casta das espécies em estudo foram removidas e fixadas em formol cálcio por 24 h. Em seguida, o material foi transferido para resina durante 48 h, e então transferido para moldes plásticos previamente preenchidos com resina e endurecedor. Os moldes foram colocados em estufa por 24 h à 37 °C. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com 4 µm com auxílio de micrótomo Leica HM 360, os cortes foram hidratados e

recolhidos em lâminas de vidro. Após secas, as lâminas foram coradas com Azul de Nilo durante 5 min à 37° C. E em seguida foram lavadas em água corrente e passadas em solução de ácido acético 1%, durante 1 min. Depois de secas, as lâminas foram montadas com gelatina glicerinada e recobertas com lamínula para observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio Olympus BX51 acoplado ao computador Intel Pentium 4.

3.5.4. TÉCNICA DO SUDAN BLACK PARA DETECÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS (BERMES, 1957)

Dez glândulas metapleurais e dez labiais de cada espécie foram removidas e fixadas em mistura aquosa de Bouin por 24 h. Em seguida, o material foi transferido para resina durante 48 h e então transferido para moldes plásticos, previamente preenchidos com resina e endurecedor. Os moldes foram colocados em estufa por 24 h à 37 °C. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com 4 µm com auxílio de micrótomo Leica HM 360, os cortes foram hidratados e recolhidos em lâminas de vidro. Após secas, as lâminas foram coradas com Sudan Black durante 15 min, em seguida, lavadas em álcool etílico 70% e novamente lavadas em água destilada por 1 min. A seguir, as lâminas foram contracoradas com vermelho neutro durante 4 min para evidenciação dos núcleos celulares e, em seguida, lavadas em água corrente. Depois as lâminas foram diafanizadas em xilol e montadas em verniz vítreo para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio Olympus BX51 acoplado ao computador Intel Pentium 4.

3.6. ANÁLISES QUÍMICAS

3.6.1. CROMATOGRAFIA GASOSA ALIADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os constituintes dos extratos das glândulas metapleurais e labiais dos indivíduos das diferentes castas de *Atta sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex rugosus*, *Acromyrmex balzanii*, *Trachymyrmex fuscus* foram analisados usando a técnica de cromatografia gasosa aliada à espectrometria de massas (CG-EM). Para otimização da qualificação e quantificação dos compostos foi desenvolvido e validado um método de análise.

As condições de análise do cromatógrafo gasoso linha 17A SHIMATZU QP5000 foram as seguintes:

- Coluna Optima-5 (30 m X 0,25 mm).

- Programa de temperatura:

Injetor = 280 °C;

Detector = 280 °C;

Temperatura inicial da análise = 80 °C (por 5 min);

Temperatura final da análise = 280 °C (por 10 min)

Taxa de aquecimento = 8 °C·min⁻¹ (total de 40 min/corrída)

3.6.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Em todos os ensaios relativos à validação do método confirmatório desenvolvido foi utilizado um extrato glandular com a glândula labial e com a metapleural.

a) Linearidade

Volumes de 0.5 mL do extrato glandular foram adicionados às soluções padrões dos analitos e padrão interno MBDB (N-metilbenzodioxazolilbutamina). Para cada concentração foram preparadas 5 replicatas e os volumes de solução padrão adicionados em cada uma estão mostrados na TABELA 3.1

Cada amostra foi brevemente agitada em vórtex, os analitos foram eluídos com 1 mL de acetato de etila (1 mL, 2 vezes) e os eluatos foram secos completamente sob atmosfera de N₂. Volumes de 1 µL foram injetados no CG-EM e analisados em duplicata. Os resultados foram analisados utilizando-se um modelo de regressão linear, ajustado com base no método dos mínimos quadrados. As razões área analito/área padrão interno correspondiam ao eixo das coordenadas (y) e as concentrações ao eixo das abscissas (x).

TABELA 3.1. Volume das soluções padrões usadas no estudo da linearidade

Número de glândulas/extrato	Vol. De cada analito adicionado (µL)		Vol. Padrão interno (µL)
	Solução Padrão (0.5µg/mL)	Solução Padrão (5µg/mL)	MBDB
0	-	-	20
10	1		20
20	10		20
30	60		20
40		100	20
50		150	20
60		200	20

b) Sensibilidade

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir dos resultados obtidos com as análises dos brancos preparados no estudo de linearidade. Para tanto, as 5 replicatas de cada branco foram analisadas 3 vezes (3 replicatas de injeção) cada uma. Os cálculos foram feitos tendo como base os valores de desvio-padrão obtidos para as razões $\text{área}_{\text{analito}}/\text{área}_{\text{padrão interno}}$ correspondentes ao branco nas análises de linearidade. As equações utilizadas nos cálculos de LD e LQ foram respectivamente.

$$3x \frac{s}{a} \quad \text{e} \quad 10x \frac{s}{a}$$

Onde,

s = desvio-padrão absoluto para todas replicatas

a = inclinação da reta, coeficiente angular da equação de ajuste do modelo linear (y = ax + b)

c) Precisão intra-dia

Esse estudo foi realizado em três níveis de concentração dos extratos, contendo: 10, 30 e 50 glândulas. A concentração de cada padrão interno foi 20 ng/mL. Ao longo de um dia, foram preparadas 3 replicatas para cada nível de concentração acima. O intervalo médio entre as replicatas de cada nível foi aproximadamente duas horas. Os resíduos foram solubilizados em 200 µL de acetato de etila. Uma alíquota de 1 µL de cada replicata foi injetada em duplicata e analisada por CG-EM. Os resultados foram expressos em porcentagem, como Coeficiente de Variação (CV), calculado a partir da equação:

$$\%CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

Onde,

s = desvio-padrão absoluto para as razões $\text{área}_{\text{analito}}/\text{área}_{\text{padrão interno}}$ de cada replicata, e

\bar{x} = valor médio das áreas sob os picos

d) Precisão inter-dia

Esse estudo também foi realizado em três níveis de concentração dos extratos, contendo: 10, 30 e 50 glândulas. A concentração de cada padrão interno foi 20 ng/mL. Uma vez por dia, ao longo de 6 dias consecutivos, 3 replicatas foram preparadas para cada nível acima. Uma alíquota de 1 µL de cada replicata foi injetada em duplicata e analisada por CG-EM. Os resultados foram expressos em porcentagem, como Coeficiente de Variação (CV), calculado a partir da equação:

$$\%CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

s = desvio-padrão absoluto para as razões $\text{área}_{\text{analito}}/\text{área}_{\text{padrão interno}}$ de cada replicata, e

\bar{x} = valor médio das áreas sob os picos

f) Estabilidade da amostra (congelamento / descongelamento)

Esse estudo também foi realizado em três níveis de concentração dos extratos, contendo: 10, 30 e 50 glândulas. A concentração de cada padrão interno foi 20 ng/mL e para cada nível, foram preparadas 3 replicatas. Após a solubilização em 200 µL de acetato de etila, volumes de 1 µL foram injetados e analisados em duplicata. O restante das amostras foi guardado no congelador.

Passadas 21 horas de congelamento e 3 horas de estabilização térmica, uma nova alíquota foi retirada de cada replicata. O tratamento e a análise dessas novas amostras foi exatamente como antes da etapa de congelamento. O restante das amostras foi novamente guardado no congelador. Essa rotina foi executada mais duas vezes, após outros dois ciclos de 21 horas de congelamento e 3 horas de estabilização. Os resultados foram expressos pelo Coeficiente de Variação. Esse coeficiente foi calculado para cada concentração após cada ciclo. Para avaliar a estabilidade geral, um coeficiente de variação total (%CV_{total}) foi calculado para cada concentração após todos os ciclos.

3.7 ANÁLISES HISTO-ENZIMÁTICAS DA GLÂNDULA LABIAL

Dez glândulas metapleurais e dez labiais das espécies estudadas foram removidas e fixadas. O material foi cortado (7 µm) e as lâminas obtidas submetidas às reações enzimáticas (Dal Pai, 1995).

a) ATPase ácida: as lâminas foram postas em tampão veronal acetato 0.1M (pH 4.4) por um período de 10 minutos a temperatura ambiente, sendo posteriormente postas em estufa a 37 °C em solução contendo cloreto de cálcio 0.18 M, 6 mL de água destilada, 2 mL de tampão barbiturato de sódio 0.1 M, 25 mg de ATP, (pH 4.4), por 40 min.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em cloreto de cálcio hexahidratado 1%, por 10 min, tratadas em cloreto de cobalto 2%, por 3 min, e lavadas em barbiturato de sódio 0.1 M por 3 min. As lâminas foram lavadas em água corrente por 30 seg e tratadas com sulfeto de amônia 1% por 10 seg. As lâminas foram novamente lavadas em água corrente e montadas com verniz vítreo.

b) ATPase alcalina: as lâminas foram postas em solução com 2 mL de barbiturato de sódio (0.1 M), 2 mL de cloreto de cálcio (0.18 M), 6 mL de água destilada (pH

10.2) por 5 min, a temperatura ambiente e posteriormente à 37 °C, em solução contendo 7.8 mL de cloreto de cálcio (0.18 M), 0.2 mL de água destilada, 2 mL na barbiturato de sódio (0.1 M), 25 mg de ATP (pH 10.2) por 40 min.

Após este tempo, as lâminas foram lavadas em cloreto de cálcio hexahidratado 1% por 10 min, tratadas em cloreto de cobalto 2% por 3 min e lavadas em barbiturato de sódio (0.1 M) por 3 min. As lâminas foram lavadas em água corrente por 30 seg, e tratadas com sulfeto de amônia 1%, por 10 seg até atingirem coloração escura, então foram novamente lavadas em água corrente e montadas com verniz vítreo.

As técnicas para detecção de ATPase ácida e ATPase alcalina evidenciam a presença de mitocôndrias, marcando-as em marrom.

c) Succinato desidrogenase (SDH): as lâminas foram postas no meio contendo: 1 mL de succinato de sódio 0.2 M, 1 mL de nitrobluetetrazolium (NBT), 2 mL de tampão fosfato 0.1 M, pH 7.4 por 40 min a 37 °C. Após isto foram lavadas em água destilada. As lâminas foram fixadas em formol cálcio de Baker por 5 min, então foram novamente lavadas em água corrente e montadas com verniz vítreo.

d) Quitinase

A atividade de quitinase foi determinada utilizando o 4-Metilumbeliferil β -D-N,N',N''-triacetilquitotrioside diluído em dimetil sulfóxido. 0.5 mL deste substrato a uma concentração de 1,0 μ M foram misturados com 0.2 mL do tampão acetato de sódio (pH, 50 mM) e 1 mL da amostra de teste (contendo 100 glândulas labiais). A atividade foi determinada por leitura de fluorescência lida em fluorómetro com λ_{ex} 320 nm e λ_{em} 460 nm.

3.8. ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS PATÓGENOS DE *Atta sexdens rubropilosa*

3.8.1- PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

Para promover o crescimento dos microrganismos patógenos dos insetos de *Atta sexdens rubropilosa*, foram preparados três meios de cultivo contendo cada um diferentes nutrientes. Os meios preparados foram: cultura ágar batata dextrose (BDA) (HIMEDIA), nutriente ágar (NA) (HIMEDIA) e meio contendo apenas ágar (A) (HIMEDIA).

Os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes utilizando a proporção de 28 g, 39 g e 14 g de meio Nutriente Ágar, Batata dextrose Ágar e meio Ágar- Ágar, respectivamente, para 1,0 L de água destilada cada um. Após a distribuição dos meios em erlenmeyrs contendo a quantidade desejada de água destilada, os mesmos foram esterilizados em autoclave por 20 min a uma temperatura de 120 °C. Após a esterilização dos meios, estes foram vertidos (aproximadamente 15 mL) em placas de Petri de vidro (90 mm) previamente esterilizadas. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. As placas foram deixadas em repouso por aproximadamente 90 min podendo ser utilizadas em seguida, sendo ainda expostas à radiação ultra-violeta por cerca de 30 min.

3.8.2- ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

O isolamento dos microrganismos foi realizado de maneira adaptada à metodologia proposta por Gusmão et al. (2007) para o isolamento de microrganismos.

Os insetos adultos foram adquiridos vivos, sendo os mesmos mortos criogenicamente utilizando um ultrafreezer vertical a -80 °C. Posteriormente, já em capela de fluxo laminar, foram realizadas as etapas de esterilização superficial (externa) do inseto e larvas a fim de eliminar microrganismos e possíveis contaminantes externos. Assim, os insetos adultos foram separadamente mergulhados em soluções de esterilização na seguinte ordem: etanol 70% (v/v); solução aquosa de hipoclorito de sódio 3% (m/v); água destilada. Por último, o excesso do solvente foi eliminado colocando rapidamente o material biológico em papel de filtro estéril. O tempo de cada imersão foi de 90 seg.

Após a esterilização, com auxílio de pinças e bisturi cirúrgico, ambos previamente esterilizados em autoclave e em radiação ultravioleta, os élitros, cabeças e pernas das formigas foram removidos e um corte ao longo da parte ventral do abdômen do inseto permitiu a retirada do trato digestivo do mesmo, que foi dividido e distribuído nos diferentes meios de cultura sólido, em placas de Petri, a fim de permitir o desenvolvimento de diferentes microrganismos.

Em placas de Petri contendo os meios de cultura citados anteriormente também foram postos o fungo simbiote e lixo da colônia, para crescimento dos microorganismos patogênicos.

3.8.3 - PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICROORGANISMOS

Um bloco do meio de cultura sólido (5 mm) contendo colônias de fungos foi retirado da placa de Petri inicialmente inoculada a parte do inseto e adicionado a uma nova placa com meio de cultura sólido de BDA. A placa foi mantida em uma incubadora B.O.D. a 28 °C para o desenvolvimento dos fungos. Na sequência, os fungos foram novamente repicados em novas placas contendo meio de cultura de BDA, seguindo o mesmo procedimento. Este procedimento foi repetido até obter cepas fúngicas purificadas.

3.8.4- PRESERVAÇÃO DOS MICROORGANISMOS

A preservação dos fungos isolados foi realizada utilizando-se de dois métodos: Castellani (1939) e em óleo mineral. Aplicando o método de Castellani, um bloco de meio de cultura sólido (BDA) de aproximadamente 5 mm de diâmetro do meio de cultura sólido contendo o fungo purificado foi colocado em um tubo de vidro estéril com tampa de rosca, contendo 4 mL de água destilada esterilizada. O tubo foi conservado a temperatura ambiente.

Pelo uso do método de óleo mineral, o fungo foi repicado para um tubo de ensaio contendo o meio de cultivo de BDA de forma inclinada (45°). Após quatro dias de desenvolvimento do fungo no meio sólido, uma quantidade de óleo mineral esterilizado foi acrescentada de forma a submergir todo o meio de cultura existente

no tubo. As amostras preservadas foram armazenadas em uma estufa B.O.D. a 25 °C.

3.9. SÍNTESE DOS ANÁLOGOS DA CERULENINA

3.9.1 - OXIDAÇÃO DE COREY-KIM DOS ÁLCOOIS PRIMÁRIOS (NORIOSHI et al., 1979)

Os álcoois primários octanol **(1)**, decanol **(2)** e dodecanol **(3)** (28,6 mmol) foram adicionados a uma solução de dimetilsulfeto de cobre (26 mmol) e K_2CO_3 (104 mmol) em 60 mL de DMF. A mistura reacional permaneceu 16 h sobre agitação a temperatura ambiente. Água e acetato de etila foram adicionados ao meio reacional e a fase orgânica lavada com solução saturada de NaCl, seca com Mg_2SO_4 , concentrada e os produtos octanal **(4)**, decanal **(5)** e dodecanal **(6)** purificados por coluna cromatográfica usando hexano e acetato de etila (95:5).

3.9.2. OLEFINAÇÃO DE HORNER-WADSWORTH-EMMONS DOS ALDEÍDOS (RENARD e GHOSEZ, 2001)

Uma solução de NaH (24,1 mmol, 60% em óleo mineral) em THF (50 mL) foi adicionado ao fosfanato de etila (18 mmol) em 20 mL de THF gota a gota à 0 °C. Após 30 min a mistura foi resfriada à -40 °C e uma solução com 30 mmol dos aldeídos **4**, **5** e **6** foram adicionadas em 18 mL de THF lentamente. A mistura foi mantida em vigorosa agitação por 5 h. A reação foi finalizada com solução de NH_4Cl (5 mL) e a fase orgânica seca com $MgSO_4$ e concentrada à vácuo. Os produtos 2-octenoato de etila **(7)**, 2-decenoato de etila **(8)** e 2-dodecenoato de etila **(9)** foram purificados em coluna de sílica Hex/ActO (95:5).

3.9.3. EPOXIDAÇÃO DOS ESTERES INSATURADOS (JAKUBOWSKI. et al., 2001)

Os alcenos obtidos **7**, **8**, **9** (32 mmol) foram misturados à 5 mL de CH₂Cl₂, sob agitação vigorosa à 20 °C. Após 5 min foram adicionados 2,5 eq de MCPBA. A reação foi mantida sob agitação por 24 h e finalizada NH₄Cl (5 mL) e a fase orgânica seca com Mg₂SO₄ e concentrada à vácuo. Os produtos 2-epoxi-octanoato de etila (**10**), 2-epoxi-decanoato de etila (**11**) e 2-epoxi-dodacenoato de etila (**12**) foram purificados em coluna de sílica Hex/ActO (95:5).

3.9.4. PREPARAÇÃO DOS γ -HIDROXI- α,β -ALQUINÓICO E RESPECTIVAS LACTONAS (YODA et al., 2011)

Foram adicionados a uma solução de iodeto de vinila (6,10 mmol) em Et₃N (50 mL), Cul (0,6 mmol) e PdCl₂(PPh₃)₂ (0,3 mmol), sob atmosfera de argônio. Após 30 min sobre rotação, foi adicionada a solução do ácido propargílico (6,10 mmol) e Et₃N (30 mL) e os aldeídos propanal, butanal e dodecanal. A agitação foi mantida por mais 6 h. A reação foi finalizada com solução de NH₄Cl (50 mL) e a Et₃N removida à vácuo. A fase aquosa foi extraída com EtOAc e secada com Na₂SO₄. Os compostos resultantes, 4-hidroxi-hex-2-inoato de etila (**13**), 4-hidroxi-oct-2-inoato de etila (**14**), 4-hidroxi-hexadec-2-inoato de etila (**15**), e 4-hidroxi-5-fenilpent-2-inoato de etila (**16**) foram purificados em coluna de sílica Hex/EtOAc (5:1). Os produtos foram solubilizados em Et₃N e adicionados o catalisador de Lindlar (0,6 mmol) promovendo a formação *in situ* das lactonas, 5-etil-furan-2(5H)-ona (**17**), 5-butil-furan-2(5H)-ona (**18**), 5-dodecil-furan-2(5H)-ona (**19**) e 5-benzil-furan-2(5H)-ona (**20**).

3.9.5. PREPARAÇÃO DAS EPÓXI-CETONAS E ABERTURA DAS LACTONAS (FURUKAWA, et al., 1988)

Os alcenos obtidos (40 mmol) foram misturados à 5 mL de CH₂Cl₂ sobre agitação vigorosa à 20 °C. Após 5 min foram adicionados 2,5 eq de NaOCl. A reação foi mantida sob agitação por 14 h e finalizada com NH₄Cl (5 mL). Os produtos foram 4-etil-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**21**), 4-butil-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**22**), 4-dodeca-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**23**) e 4-benzil-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**24**). A fase orgânica foi seca com Mg₂SO₄ e concentrada à vácuo. Os produtos foram purificados em coluna de sílica Hex/ActO (95:5). Os produtos foram adicionados à NH₃ (12 mmol) promovendo a abertura das lactonas, formando os álcoois 3-(1-hidroxipropil)-oxirano-carboxiamida (**25**), 3-(1-hidroxipentil)-oxirano-carboxiamida (**26**), 3-(1-hidroxitridecil)-oxirano-carboxiamida (**27**), 3-(1-hidro-2-pheniletil)-oxirano-carboxiamida (**28**).

3.9.6. PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DICARBONÍLICOS (MANI, 1997)

Os álcoois obtidos, **25**, **26**, **27**, **28** (50 mmol) foram solubilizados em CH₂Cl₂ (30 mL) e adicionado DMSO (20 mmol) e DIPEA (10 mmol) à 0 °C, sobre atmosfera de argônio. Após 5 min SO₃.py (5,4 mmol) foi adicionado gota a gota. A reação foi mantida sob agitação por 6 h e finalizada com NaHCO₃ (5mL) e extraída com CH₂Cl₂. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e concentrada a vácuo. Os produtos, 3-propionil-oxirano-2-carboxiamida (**29**), 3-pentanoil-oxirano-2-carboxiamida (**30**), 3-tridecanoil-oxirano-2-carboxiamida (**31**) e 3-pentilacetil-ioxirano-2-carboxiamida (**32**), foram purificado em coluna de sílica Hex/ActO (95:5).

3.10. BIOENSAIOS

3.10.1. TESTE DE TOXICIDADE POR INGESTÃO COM *Atta sexdens rubropilosa*

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram coletadas operárias de *A. sexdens rubropilosa* com massa corpórea variando de 15 a 25 mg e largura da cápsula cefálica entre 2,0 e 2,8 mm. As formigas foram obtidas de um ninho adulto, mantido em sala climatizada com temperatura de 24 ± 1 °C e U.R. acima de 70 % no Laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

Para manutenção das formigas isoladas do formigueiro, conseqüentemente na ausência do fungo simbiote, foram preparadas dietas sólidas, cada uma contendo 5 % de glicose, 1 % de peptona bacteriológica, 0,1 % de extrato de levedura e 1,5 % de ágar bacteriológico, dissolvidos em 100 mL de água destilada (BUENO et al., 1997). Após a mistura das substâncias, as dietas foram levadas ao forno microondas para melhor solubilização e homogeneização. Depois, foram autoclavadas a 120 °C e 1 atm por 15 minutos. Em uma sala esterilizada por raios UV, as dietas, ainda líquidas, foram vertidas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro previamente esterilizadas na autoclave e, após o resfriamento das dietas, as placas foram envolvidas com filme PVC e mantidas na geladeira para melhor conservação durante o período dos bioensaios.

Com o auxílio de uma pinça entomológica realizou-se a coleta das formigas do ninho, sendo estas depositadas em uma bandeja de plástico com as bordas revestidas com Teflon-30 para evitar fugas. No interior da bandeja foi colocado um chumaço de algodão embebido em água para manter a umidade ideal às formigas.

Para cada uma das três concentrações utilizadas (0,2; 1,0 e 2,0 mg/mL) de cada um dos compostos sintetizados foram separadas 5 placas de Petri com 10 cm de diâmetro, previamente esterilizadas e forradas com papel filtro, contendo 10 formigas em cada uma delas. Essas placas foram mantidas em estufa para B.O.D.

com temperatura média de 24 ± 1 °C e umidade relativa acima de 70 %. A cada 24 h as dietas foram renovadas e, sempre que necessário, os papéis filtro foram trocados a fim de se evitar o desenvolvimento de microorganismos contaminantes, bem como manter o ambiente limpo para as formigas. Diariamente foram efetuadas as retiradas e anotações das formigas mortas. As dietas foram colocadas em pedaços de papel alumínio na quantidade aproximada de 0,4 a 0,5 g/placa.

Foi estipulado um período máximo de 25 dias para a realização dos experimentos de toxicidade levando em consideração o período normal de sobrevivência das formigas mantidas com uma dieta artificial fora do formigueiro.

Os extratos e substâncias foram incorporados na dieta utilizando o método *dry-mix*, que consiste em acrescentar o princípio ativo à glicose e os demais ingredientes secos da dieta e, posteriormente, à água destilada, não utilizando solvente. O extrato ou substância pura foi incorporado nas concentrações 0,1 mg/mL (0,1 %), 1,0 mg/mL (1 %) e 2,0 mg/mL (2 %).

No bioensaio foi utilizado um controle que constituiu no oferecimento de apenas dieta artificial com o intuito de verificar a interferência do manuseio na sobrevivência das formigas. Os dados foram avaliados graficamente e também submetidos à análise comparativa das curvas de sobrevivência dos vários tratamentos. Os dados do bioensaio por ingestão foram avaliados através da elaboração das curvas de sobrevivência, a partir da porcentagem de formigas vivas por dia, no conjunto das 5 placas. A comparação entre as curvas de sobrevivência das operárias do grupo controle com aquelas dos tratamentos foi realizada com o emprego do *Long-rank test* (CARR. e DURHAM, 1978), utilizando-se o software Graph-PadPrism (versão 3.0).

3.11. ENSAIOS ENZIMÁTICOS

3.11.1. ACETILCOLINESTERASE (AChE)

As amostras foram submetidas a ensaios para determinação de atividade inibitória para a enzima acetilcolinesterase (AChE). Os ensaios realizados foram: 1º Ensaio em Cromatografia de Camada Delgada (CCD); Ensaio de falso positivo Ellman e 2º Ensaio com os biorreatores (ELLMAN et al., 1961).

Os ensaios de atividade foram feitos de acordo com o método modificado de Ellmann. Tal método baseia-se na medida da velocidade de produção da tiocolina formada através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetiltiocolina. A tiocolina formada reage com o chamado Reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico]) (**43**) formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo com intensa absorção em 412 nm, FIGURA 3.2.

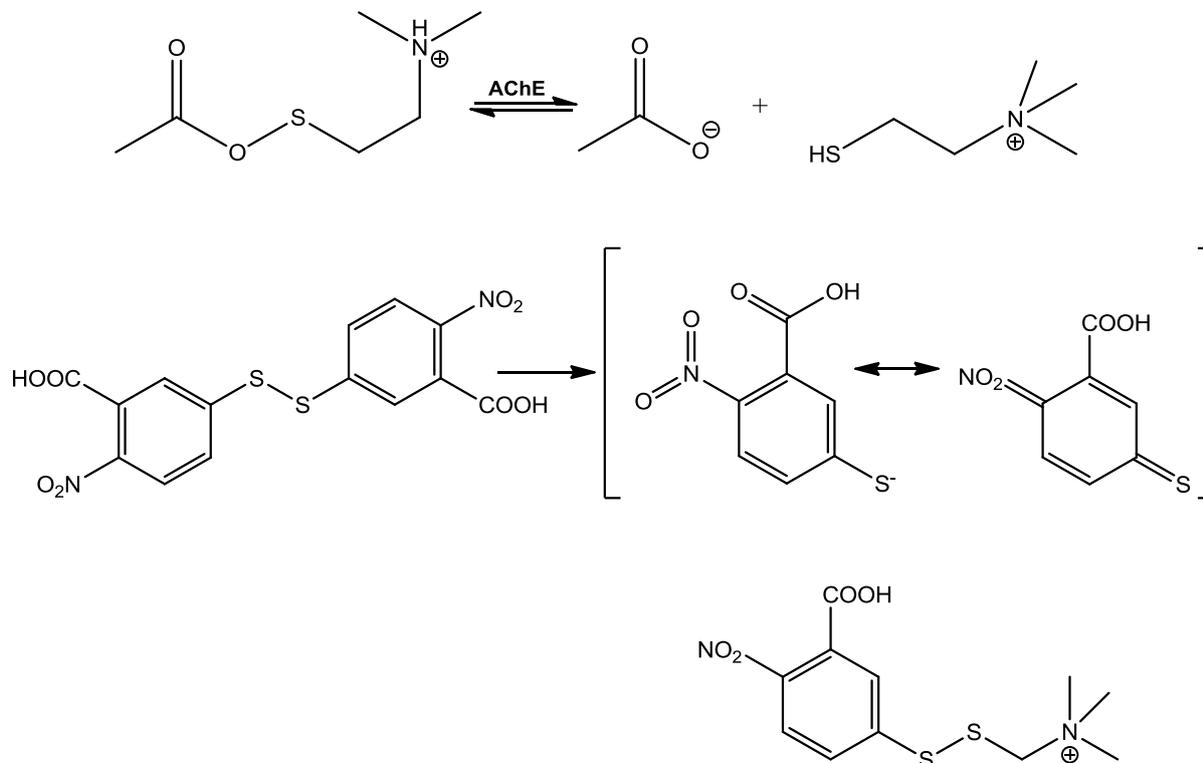


FIGURA 3.2. Catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman.

Os biorreatores denominados ICERs de 30 cm x 0,01 mm em capilar de sílica fundida foram preparados pela imobilização de 2 colinesterase diferentes resultando em:

- ICER-AChE-ee – com a enzima Acetilcolinesterase (*Electrophorus electricus*) imobilizada;
- ICER-AChE-ee com a enzima Acetilcolinesterase de eritrócitos humanos;

Os ICERs foram utilizados como colunas acopladas ao HPLC.

O Monitoramento do produto da reação enzimática pela observação da banda cromatográfica correspondente á formação do produto da reação enzimática foram realizados nas seguintes condições:

- Fase móvel: Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e DTNB (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico] 0,1 mM;
- Amostra injetada: 10 µL da solução contendo: 1 mM de Acetiltiocolina (substrato análogo da tiocolina em concentração de saturação)
- Vazão: 0,05 mL/min;
- Detector DAD-UV: 412 nm;

O Cromatograma apresentado na FIGURA 3.3 mostra a diminuição da banda cromatográfica referente ao produto na presença do inibidor padrão Tacrina.

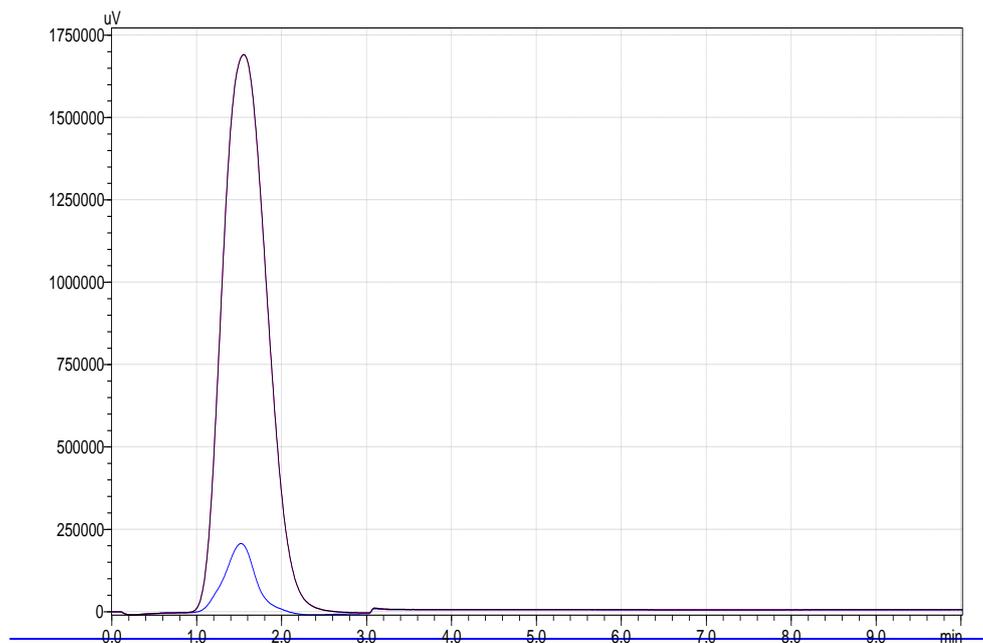


FIGURA 3.3. O percentual de inibição foi obtido comparando-se a atividade da enzima na presença do inibidor (V_i) com a atividade inicial da enzima (V_0), de acordo com a equação: (% de inibição = $1 - [V_i - V_0] \times 100$). — Ausência de inibidor — Presença de inibidor

As amostras foram preparadas na concentração de 1 mM e solubilizadas em 50 % água 50 % metanol. Para este ensaio foi preparada 1 placa cromatográfica de sílica gel 60 com a realização de eluição em uma fase $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 65:30:5 (v/v). Volumes de 2,5 μL de cada amostra foram aplicados nas placas. As seguintes soluções foram preparadas e utilizadas no ensaio:

- A) 80 mL água deionizada + 0,1825 g tris \rightarrow Tampão A (T.A.), pH= 8,0 (ajustar com HCl 10 % v/v);
- B) 0,0099 g reagente de Ellman + 25 mL de A (TA)
- C) 0,00723 g ACTHl (iodeto de acetiltiocolina) + 25 mL A (TA);
- D) 0,704 mg de AChE + 300 μL água MiliQ;
- E) 0,025 g albumina sérica bovina (BSA) + 25 mL de TA;
- F) 15 μL da solução D e misturar com 5 mL de solução E.

Após a eluição e secagem das placas, as soluções (C) e (F) foram borrifadas sobre as placas de sílica e incubadas por 15 minutos á 37 °C. Após, borrifou-se a solução de (B). O padrão utilizado foi a Galantamina e aplicado no final da cada placa.

A partir da diluição das soluções estoque das amostras (1 mM), foram preparadas soluções de 200 µM para cada composto: 60 µL da solução de tampão de trabalho, 20 µL da solução do inibidor e 20 µL da solução de ACTH1 para o ensaio com o ICER-AChE. O volume final em ambos os ensaios foi de 100 µL. As soluções foram preparadas em duplicatas e alíquotas de 10 µL foram injetadas em cada ICER independentemente. Os percentuais de inibição em ambos os casos acima foram obtidos comparando-se a atividade da enzima na presença do inibidor (A_i) com a atividade inicial da enzima (A_0), de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = \left[1 - \frac{A_i}{A_0} \right] \times 100$$

3.11.2 – ÁCIDO GRAXO SINTASE (STRAUB et al., 2002)

Segue o mesmo princípio descrito à cima para os ensaios em Cromatografia de Camada Delgada (CCD) usando as mesmas concentrações. A partir da leitura em placas de Elisa é possível monitorar a razão de oxidação de NAPH na presença do Acetil-CoA e malonil-CoA.

4. Resultados e discussão

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1. A GLÂNDULA METAPLEURAL

4.1.1 HISTOLOGIA

A morfologia das glândulas metapleurais das espécies analisadas mostrou-se bem semelhante. Todas são constituídas por células secretoras agrupadas, para as espécies de *Atta* foram encontradas de 18-24 células, para *Acromyrmex* de 16-22 células e para *Trachymyrmex* de 16-20 células. Em todos os casos não ocorre fusão de citoplasmas, desta forma cada célula é considerada uma unidade independente. De cada célula, individualmente, parte um canalículo condutor que têm duas porções: uma intracitoplasmática e outra extracitoplasmática. Estes canalículos chegam em grupos até a placa perfurada da câmara coletora, e desta a secreção produzida é encaminhada para o reservatório. As células secretoras têm forma ovalada ou alongada e contem apenas um núcleo, Fig. 4.1. A câmara coletora é um estreitamento do reservatório (onde desembocarão os canalículos coletores) sendo revestido por epitélio pavimentoso simples.

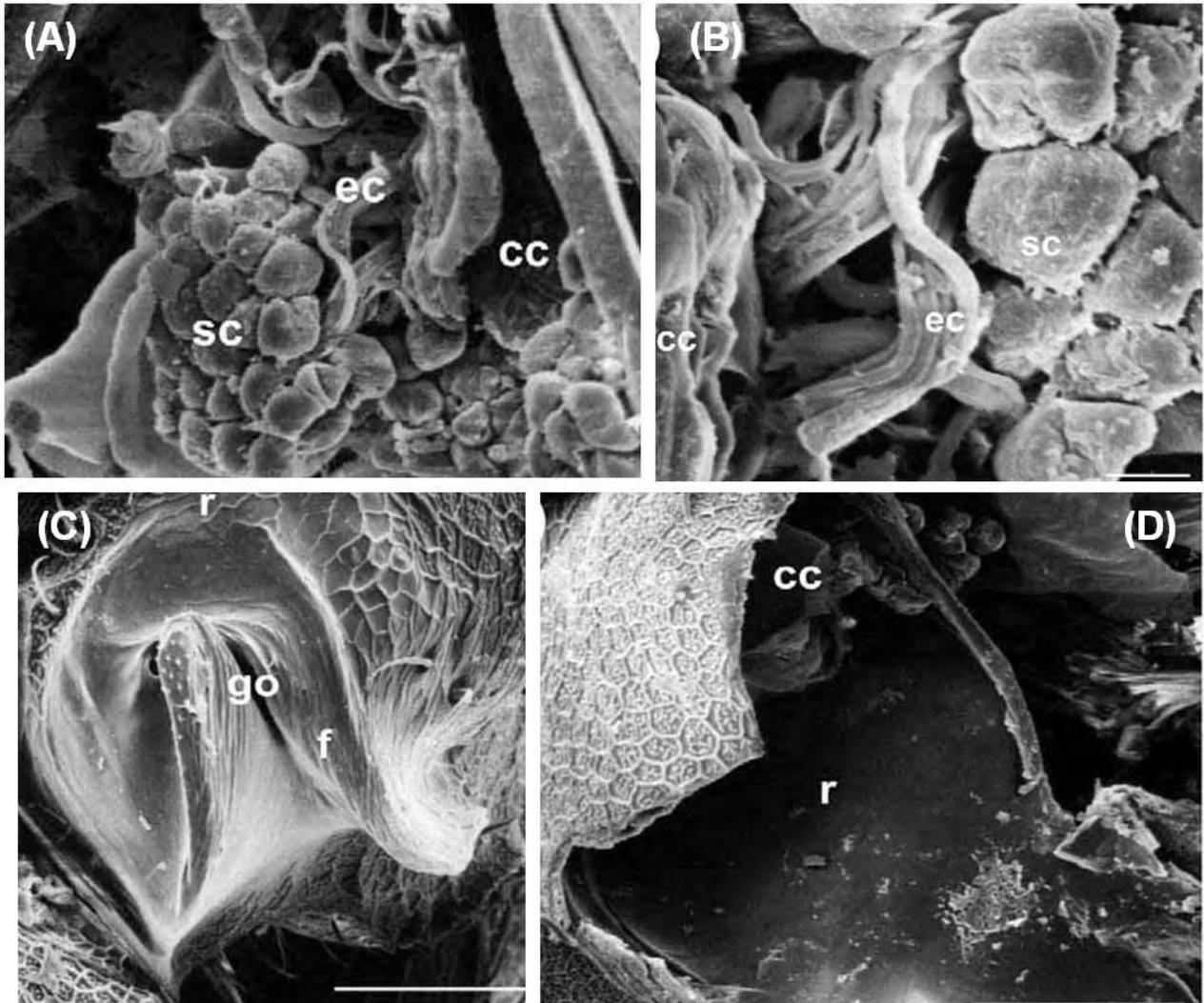


FIGURA 4. 1.Microscopia eletrônica de varredura da glândula metapleural de operária de *Atta sexdens rubropilosa*. Células secretoras (sc) e canalículo extracitoplasmático (ce), Camara coletora (cc), reservatório (r); escala 10µm.

A mesma morfologia já tinha sido evidenciada para outras espécies de atines, como em *Acromyrmex subterraneus* (De Souza et al., 2006), *Acromyrmex octospinosus* (Bot et al., 2001) e *Atta bisphaerica* (Gusmão, 2000).

Em todas as espécies de forma geral, as células secretoras há presença de núcleo com predominância de cromatina descondensada, evidenciado pela técnica da hematoxilina de Harris, FIGURA 4.2. Tal fato ocorre principalmente nas operárias médias e grandes de *Atta sexdens rubropilosa* e na rainha. De acordo com Alberts et al. (2004), estas células são responsáveis por uma ativa síntese protéica.

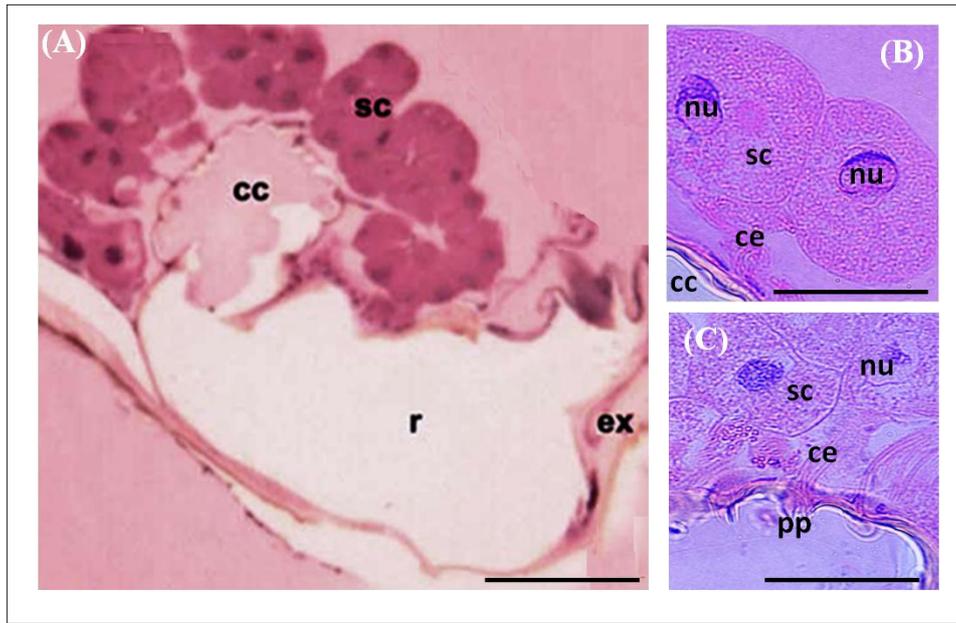


FIGURA 4.2. Vista geral da glândula metapleural das três espécies **(A)** *Atta sexdens rubropilosa* mostrando célula secretora (sc), câmara coletora (cc), e reservatório (r), Barra de escala = 40 μ m **(B)** cada célula secretora (sc) possui um núcleo (nu) é ligada por um canaliculo extracitoplasmático (ce) são unidades individuais, Barra de escala = 10 μ m **(C)** células secretoras (sc), detalhe da placa perfurada (pp), porção final do canaliculos onde é depositada a secreção na câmara coletora (cc), Barra de escala = 10 μ m .

Segundo classificação de Noirot e Quennedey (1991) as células secretoras das glândulas metapleurais das espécies seriam da classe III, visto que possuem canaliculos cuticulares coletores divididos em duas porções intracelular (ou intracitoplasmática) e extracelular. A porção intracitoplasmática dos canaliculos coletaria imediatamente a secreção recém produzida pela célula. Essa porção provavelmente seja também responsável pela modificação da secreção, pois frequentemente células secretoras da classe III possuem a porção intracitoplasmática dos canaliculos rodeada por microvilosidades. A porção extracitoplasmática condutora da secreção da célula até a câmara coletora, região inicial do reservatório, perderia essas microvilosidades e seria de fato apenas condutora.

4.1.2. MORFOMETRIA

Com exceção de *Trachymyrmex fuscus*, onde não há polimorfismo, logo as operárias apresentam o mesmo tamanho, procedeu-se com análise morfométrica para as espécies analisadas.

Para as duas espécies de *Atta* e duas de *Acromyrmex* foi possível observar uma correlação positiva entre o diâmetro do reservatório das três castas e o comprimento da cabeça (Figs. 4.3 a 4.6), a correlação foi mais evidente no gênero *Atta*.

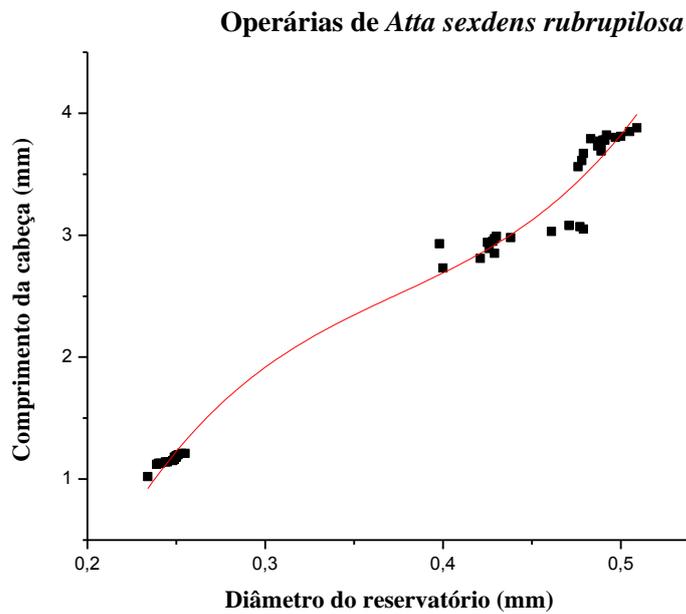


FIGURA 4.3. Relação entre o comprimento da cápsula cefálica e diâmetro do reservatório da glândula metapleurar para *Atta sexdens rubropilosa* ($r = 0.977$; $p = 0.001$).

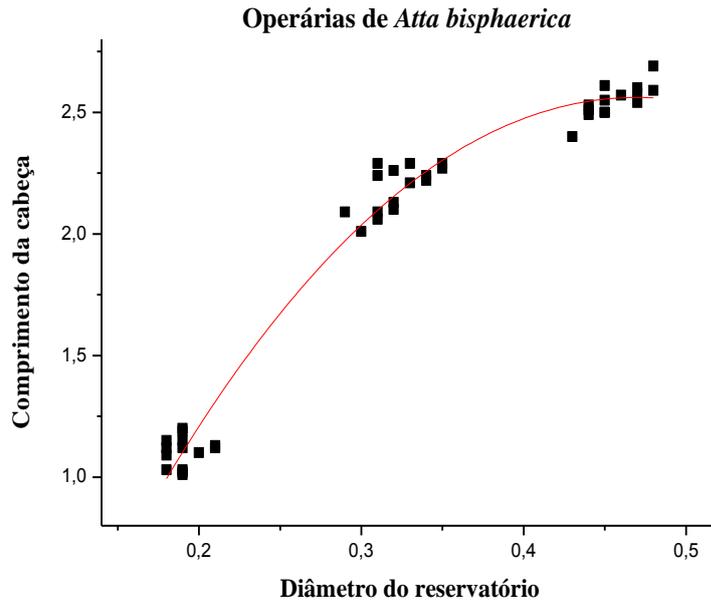


FIGURA 4.4. Relação entre o comprimento da cápsula cefálica e diâmetro do reservatório da glândula metapleural para *Atta bisphaerica* ($r = 0.983$; $p = 0.001$).

No gênero *Acromyrmex* o polimorfismo é menos acentuado do que o observado para *Atta*.

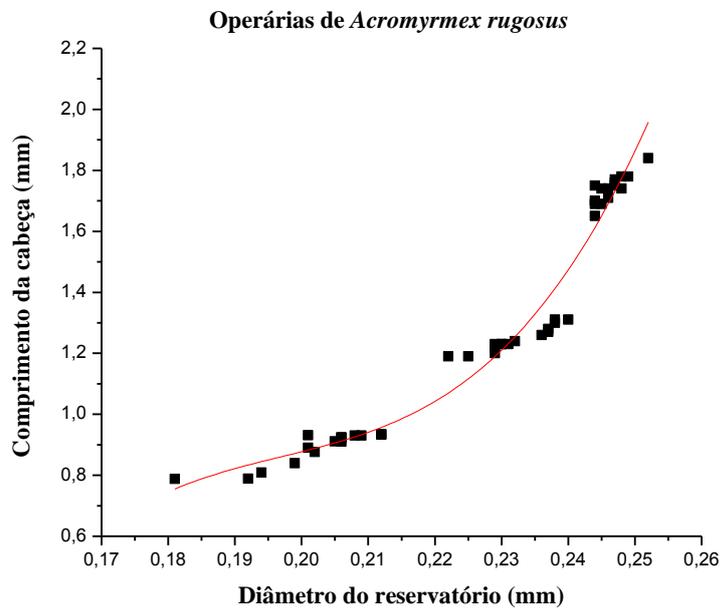


FIGURA 4.5. Relação entre o comprimento da cápsula cefálica e diâmetro do reservatório da glândula metapleural para *Acromyrmex rugosus* ($r = 0.984$; $p = 0.001$).

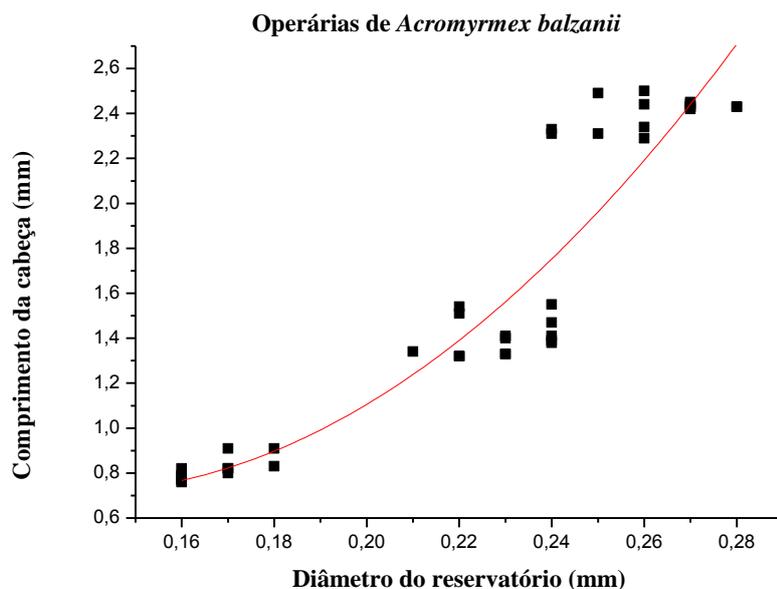


FIGURA 4.6. Relação entre o comprimento da cápsula cefálica e diâmetro do reservatório da glândula metapleurar para *Acromyrmex balzanii* ($r = 0.988$; $p = 0.001$).

Outros trabalhos morfológicos com glândula metapleurar realizados por Wilson 1980; Bot e Boosmsma, 1996; Bot *et al.*, 2001, mostraram que o diâmetro do reservatório poderia ser usado como parâmetro para se estimar o tamanho da glândula metapleurar, desta forma as operárias mínimas de *Acromyrmex octospinosus* (Bot *et al.*, 2001) apresentaram um total de cerca de 200-300 células secretoras, operárias médias de 350-450 células secretoras e operárias grandes cerca de 500 a 600 células secretoras, dados esses que se correlacionariam positivamente com o tamanho do reservatório, indicando que quanto maior o número de células maior seria o tamanho do reservatório. Então, o maior tamanho da glândula metapleurar poderia implicar na maior capacidade para produção de secreção, no caso substâncias antibióticas. No entanto trabalhos recentes mostram que as operárias mínimas são mais resistentes à contaminação com os fungos *Metarhizium anisopliae* (Hughes *et al.*, 2002) e *Aspergillus nomius* (Polsen *et al.*, 2006). No caso de *A. nomius* tal fato só é observado se as operárias forem tratadas com uma dose de inóculo correspondente ao tamanho. Já *M. anisopliae* as mínimas apresentam maior resistência mesmo tratadas com doses iguais as aplicadas em maiores operárias. Esta diferença de resistência ocorreria, segundo os autores, pois

as operárias mínimas estão em constante contato com o fungo e logo seriam mais resistentes à microorganismos patogênicos. Os resultados até agora obtidos indicam que os indivíduos de todas as castas operárias participam ativamente no combate aos microorganismos. Apesar de cada casta estar relacionada à trabalhos específicos, todas fazem parte de um único super-organismo. As mínimas têm função de cultivar o jardim de fungo e mantê-lo livre de microorganismos prejudiciais, as operárias médias realizam várias tarefas dentro do ninho e fora dele, como forrageamento, e por último aos soldados cabe a função de proteção da colônia e também cortam e transportam material vegetal. Assim, todos os indivíduos estão ligados à manutenção asséptica dentro do ninho e, talvez mais importante fora dele, já que a entrada e saída de indivíduos que ocorre durante o forrageamento pode ser um fator crucial para a contaminação.

4.1.3 HISTOQUÍMICA

4.1.3.1 DETECÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Com a técnica do PAS/alcian blue foi possível observar que todas as espécies assim como indivíduos das diferentes castas apresentam constituintes de natureza polissacarídica, as reações foram positivas para glicoproteínas e polissacarídeos ácidos.

Com relação aos canalículos houve diferentes níveis de reação, intracitoplasmáticos dos indivíduos das cinco espécies não reagiram ao teste aplicado, no entanto, os canalículos extracitoplasmáticos reagiram com fraca positividade para glicoproteínas e moderada positividade para polissacarídeos ácidos.

4.1.3.2 DETECÇÃO DE PROTEÍNAS

Para a detecção desta classe de substâncias foi aplicada a técnica do azul de bromofenol às glândulas sendo observada a marcação positiva para as mesmas. Com exceção do lúmen dos canalículos intra e extracitoplasmáticos, os outros

componentes glandulares reagiram fortemente para proteínas nas cinco espécies estudadas.

O fato de que a periferia dos canalículos intracitoplasmáticos tenha apresentado forte positividade para proteínas, corrobora as funções dos mesmos: coletores e de transportadores da secreção. Além disso, ainda podem estar modificando tal secreção reabsorvendo os elementos que podem ser reaproveitados pelas formigas. Outro fato que suporta a modificação da secreção foram as reações da porção extracitoplasmática dos canalículos onde foi observado positividade moderada para proteínas, fraca para glicoproteínas, moderada a forte para lipídios ácidos e totais e, forte para polissacarídeos ácidos, mostrando que a composição que saiu do citoplasma é diferente da encontrada na porção extracitoplasmática dos canalículos. Este mesmo comportamento é observado em glândulas salivares de mamíferos, em que a secreção salivar é modificada antes de ser liberada para o exterior (Junqueira e Carneiro, 2008).

4.1.3.3 DETECÇÃO DE LIPÍDIOS ÁCIDOS

Por meio desta técnica foi possível observar a presença de lipídeos ácidos nas células secretoras para todas as espécies, visto a reação de forte positividade ao teste para citoplasma das células e lúmen dos canalículos intra e extracitoplasmáticos.

4.1.3.4 DETECÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS

Os testes com Sudan Black evidenciaram a presença de lipídios totais nas glândulas metapleurais de todas as espécies. O citoplasma das células secretoras, canalículos extracitoplasmáticos reagiram com forte positividade ao teste aplicado, nas três castas operárias.

Para melhor visualização dos resultados, os testes histoquímicos para as cinco espécies foram resumidos nas TABELAS. (4.1 à 4.5) seguintes.

TABELA 4.1. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas metapleurais das operárias das três castas de *Atta sexdens rubropilosa*.

Porções da Glândula Metapleural	Testes Histoquímicos Aplicados				
	PAS	Alcian blue	Azul de bromofenol	Azul de Nilo	Sudan black
Citoplasma das células secretoras	R ++	R +++	R +++	R +++	R +++
	Gr +	Gr +++	Gr +++	Gr +++	Gr +++
	Me +	Me +++	Me +++	Me +++	Me +++
	Mi +	Mi +++	Mi +++	Mi +++	Mi +++
Periferia do canalículo intracitoplasmático	R +	R -	R +++	R +	R -
	Gr -	Gr -	Gr +++	Gr -	Gr -
	Me -	Me -	Me +++	Me -	Me -
	Mi -	Mi -	Mi +++	Mi -	Mi -
Canalículo extracitoplasmático	R ++	R ++	R +++	R +++	R +++
	Gr +	Gr ++	Gr +++	Gr ++	Gr +++
	Me +	Me ++	Me +++	Me ++	Me +++
	Mi +	Mi ++	Mi +++	Mi ++	Mi +++
Lúmen dos canalículos intra e extracitoplasmático	R -	R +++	R ++	R +++	R -
	Gr -	Gr +++	Gr +	Gr +++	Gr -
	Me -	Me +++	Me +	Me +++	Me -
	Mi -	Mi +++	Mi +	Mi +++	Mi -
Células do epitélio de revestimento da câmara coletora	R +	R +++	R +++	R ++	R ++
	Gr +	Gr ++	Gr +++	Gr ++	Gr ++
	Me +	Me ++	Me +++	Me ++	Me ++
	Mi +	Mi ++	Mi +++	Mi ++	Mi ++
Células do epitélio de revestimento do reservatório	R +	R ++	R +++	R ++	R ++
	Gr +	Gr ++	Gr +++	Gr ++	Gr ++
	Me +	Me ++	Me +++	Me ++	Me ++
	Mi +	Mi ++	Mi +++	Mi ++	Mi ++

R= rainha; Gr = operária grande; Me = operária média; Mi = operária mínima. (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (-) negativo.

A rainha, apesar de não apresentar diferenciação quali e quantitativa das classes de compostos analisadas pela histoquímica, tem cerca de duas vezes mais células secretoras do que a operárias, reforçando a importância da assepsia preventiva no local de postura que é crucial para o sucesso na fundação de uma nova colônia (Angus *et al.*, 1996; Holldobler e Wilson, 2008).

TABELA 4.2. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas metapleurais das operárias das três castas de *Atta bisphaerica*.

Porções da Glândula Metapleural	Testes Histoquímicos Aplicados				
	PAS	Alcian blue	Azul de bromofenol	Azul de Nilo	Sudan black
Citoplasma das células secretoras	R ++	R +++	R +++	R +++	R +++
	Gr +	Gr +++	Gr +++	Gr +++	Gr +++
	Me +	Me +++	Me +++	Me +++	Me +++
	Mi +	Mi +++	Mi +++	Mi +++	Mi +++
Periferia do canalículo intracitoplasmático	R +	R -	R +++	R +	R -
	Gr -	Gr -	Gr +++	Gr -	Gr -
	Me -	Me -	Me +++	Me -	Me -
	Mi -	Mi -	Mi +++	Mi -	Mi -
Canalículo extracitoplasmático	R ++	R ++	R +++	R +++	R +++
	Gr +	Gr ++	Gr +++	Gr +	Gr +++
	Me +	Me ++	Me ++	Me ++	Me +++
	Mi +	Mi ++	Mi +++	Mi ++	Mi ++
Lúmen dos canalículos intra e extracitoplasmático	R -	R +++	R ++	R +++	R -
	Gr -	Gr +++	Gr +	Gr +++	Gr -
	Me -	Me ++	Me +	Me +++	Me -
	Mi -	Mi +++	Mi +	Mi +++	Mi -
Células do epitélio de revestimento da câmara coletora	R ++	R +++	R +++	R ++	R ++
	Gr +	Gr ++	Gr ++	Gr ++	Gr ++
	Me +	Me ++	Me +++	Me ++	Me ++
	Mi +	Mi ++	Mi +++	Mi ++	Mi ++
Células do epitélio de revestimento do reservatório	R +	R ++	R +++	R ++	R ++
	Gr +	Gr ++	Gr +++	Gr ++	Gr ++
	Me +	Me ++	Me ++	Me ++	Me ++
	Mi +	Mi +	Mi ++	Mi +	Mi +

Gr = operária grande; Me = operária média; Mi = operária mínima. (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (-) negativo.

TABELA 4.3. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas metapleurais das operárias das três castas de *Acromyrmex rugosus*.

Porções da Glândula Metapleural	Testes Histoquímicos Aplicados				
	PAS	Alcian blue	Azul de bromofenol	Azul de Nilo	Sudan black
Citoplasma das células secretoras	Gr +	Gr +++	Gr +++	Gr +++	Gr +++
	Me +	Me +++	Me +++	Me +++	Me +++
	Mi +	Mi +++	Mi +++	Mi +++	Mi +++
Periferia do canalículo intracitoplasmático	Gr -	Gr -	Gr +++	Gr -	Gr -
	Me -	Me -	Me +++	Me -	Me -
	Mi -	Mi -	Mi +++	Mi -	Mi -
Canalículo extracitoplasmático	Gr +	Gr ++	Gr +++	Gr ++	Gr +++
	Me +	Me ++	Me +++	Me ++	Me +++
	Mi +	Mi ++	Mi +++	Mi ++	Mi +++
Lúmen dos canalículos intra e extracitoplasmático	Gr -	Gr +++	Gr +	Gr +++	Gr -
	Me -	Me +++	Me +	Me +++	Me -
	Mi -	Mi +++	Mi +	Mi +++	Mi -
Células do epitélio de revestimento da câmara coletora	Gr +	Gr ++	Gr +++	Gr ++	Gr ++
	Me +	Me ++	Me +++	Me ++	Me ++
	Mi +	Mi ++	Mi +++	Mi ++	Mi ++
Células do epitélio de revestimento do reservatório	Gr +	Gr ++	Gr +++	Gr ++	Gr ++
	Me +	Me ++	Me +++	Me ++	Me ++
	Mi +	Mi ++	Mi +++	Mi ++	Mi ++

Gr = operária grande; Me = operária média; Mi = operária mínima. (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (-) negativo.

TABELA 4.4. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas metapleurais das operárias das três castas de *Acromyrmex balzanii*.

Porções da Glândula Metapleural	Testes Histoquímicos Aplicados				
	PAS	Alcian blue	Azul de bromofenol	Azul de Nilo	Sudan black
Citoplasma das células secretoras	Gr +	Gr +++	Gr +++	Gr +++	Gr +++
	Me +	Me +++	Me +++	Me +++	Me +++
	Mi +	Mi +++	Mi +++	Mi +++	Mi +++
Periferia do canalículo intracitoplasmático	Gr -	Gr -	Gr +++	Gr -	Gr -
	Me -	Me -	Me +++	Me -	Me -
	Mi -	Mi -	Mi +++	Mi -	Mi -
Canalículo extracitoplasmático	Gr +	Gr ++	Gr +++	Gr ++	Gr +++
	Me +	Me ++	Me +++	Me ++	Me +++
	Mi +	Mi ++	Mi +++	Mi ++	Mi +++
Lúmen dos canalículos intra e extracitoplasmático	Gr -	Gr +++	Gr +	Gr +++	Gr -
	Me -	Me +++	Me +	Me +++	Me -
	Mi -	Mi +++	Mi +	Mi +++	Mi -
Células do epitélio de revestimento da câmara coletora	Gr +	Gr ++	Gr +++	Gr ++	Gr ++
	Me +	Me ++	Me +++	Me ++	Me ++
	Mi +	Mi ++	Mi +++	Mi ++	Mi ++
Células do epitélio de revestimento do reservatório	Gr +	Gr ++	Gr +++	Gr ++	Gr ++
	Me +	Me ++	Me +++	Me ++	Me ++
	Mi +	Mi ++	Mi +++	Mi ++	Mi ++

Gr = operária grande; Me = operária média; Mi = operária mínima. (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (-) negativo.

TABELA 4.5. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas metapleurais das operárias das três castas de *Trachymyrmex fuscus*.

Porções da Glândula Metapleural	Testes Histoquímicos Aplicados				
	PAS	Alcian blue	Azul de bromofenol	Azul de Nilo	Sudan black
Citoplasma das células secretoras	+	++	+++	++	++
Periferia do canalículo intracitoplasmático	-	-	++	-	-
Canalículo extracitoplasmático	++	+	++	+	++
Lúmen dos canalículos intra e extracitoplasmático	-	++	+	++	-
Células do epitélio de revestimento do reservatório	+	++	++	+	+

(+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (-) negativo.

Para *Trachymyrmex fuscus* não foi observada a presença da câmara coletora cuticular. Esta é característica do gênero *Atta* sp. e já foi relatada em espécies de *Acromyrmex* (Vieira, et. al., 2011), e demonstra o elevado grau de derivação destas espécies, se comparadas às *Trachymyrmex* sp. que são consideradas de nível intermediário entre as attinis.

Todas as classes de compostos analisadas pela histoquímica da glândula metapleural nas operárias estavam presentes também nas rainhas, ou seja, secreção de natureza glicoproteica, FIGURAS 4.7. e 4.8. Contudo, como mencionado anteriormente, cabe ressaltar que a classe sexuada tem cerca de duas vezes mais células secretoras do que as operárias. Sendo, no período de fundação, a rainha é o único indivíduo responsável por manter a assepsia, o maior número de células secretoras, acarreta maior volume de secreção produzido. Desta forma, este é fator de grande contribuição à assepsia preventiva no local de postura, que é crucial para o sucesso na fundação de uma nova colônia.

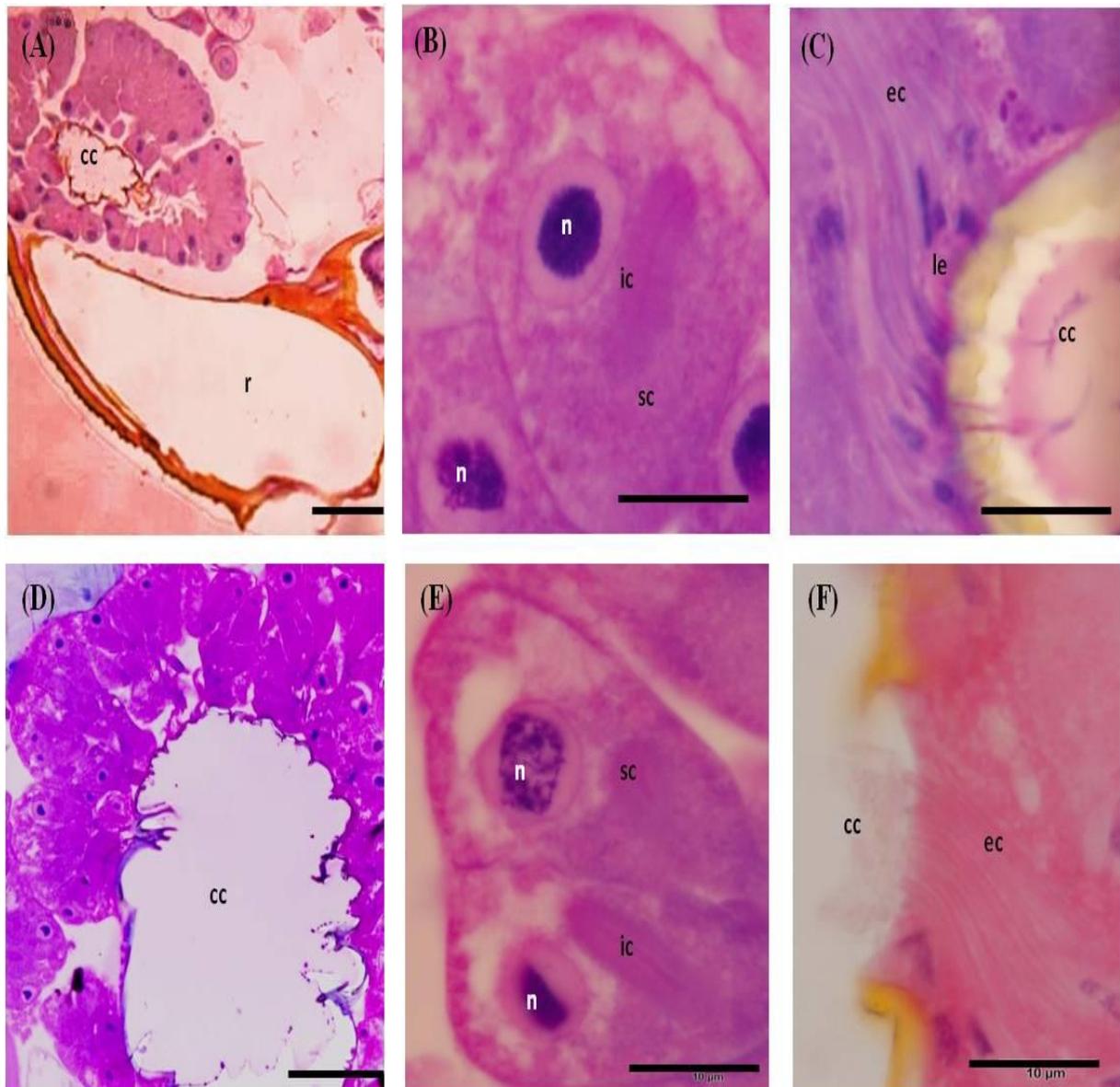


FIGURA 4.7. Vista geral da glândula metapleural da rainha de **(A)** *Atta bisphaerica* mostrando célula secretora (cs), câmara coletora (cc), e reservatório (r), Barra de escala = 40 μm **(B)** cada célula secretora (cs) possui um núcleo (nu) é ligada por um canalículo extracitoplasmático (ce) são unidades individuais, Barra de escala = 10 μm **(C)** rainha de *Acromyrmex rugosus*, detalhe células secretoras (sc), detalhe da placa perfurada (pp), porção final do canalículo onde é depositada a secreção na câmara coletora (cc), Barra de escala = 10 μm . *Acromyrmex balzanii* **(D)** focalizando célula secretora (cs), câmara coletora (cc) Barra de escala = 20 μm **(E)** detalhe da célula secretora (cs), núcleo (nu) e canalículo extracitoplasmático (ce) são unidades individuais, Barra de escala = 10 μm **(F)** detalhe da placa perfurada (pp), porção final do canalículo onde é depositada a secreção na câmara coletora (cc), Barra de escala = 10 μm .

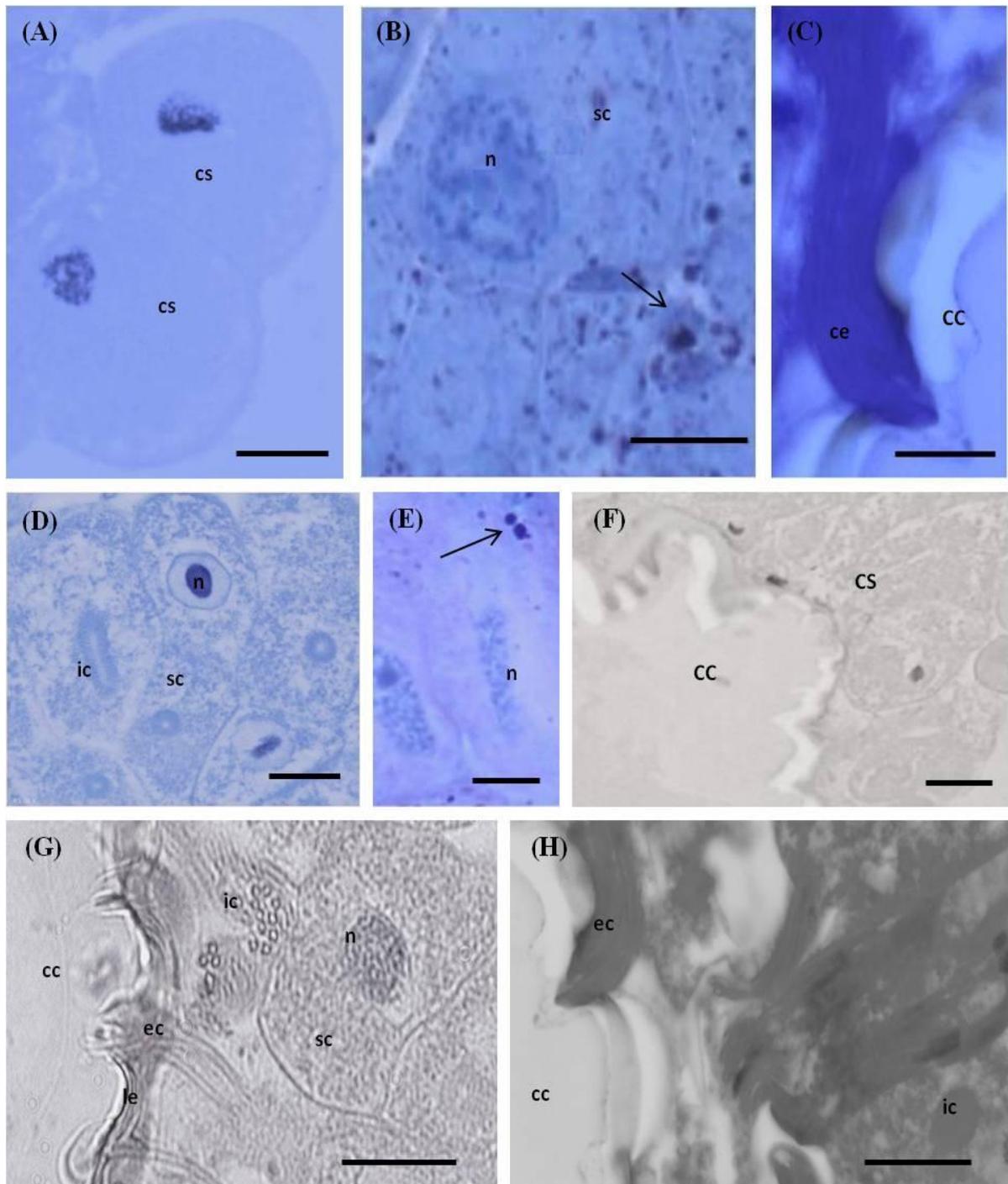


FIGURA 4.8 *Atta bisphaerica* (A, D e G); *Acromyrmex rugosus* (B, C e H) e *Acromyrmex balzanii* (E-F) Células secretoras (cs), núcleo (n), reservatório (r), câmara coletora (cc), canalículo intracitoplasmático (ci), canalículo extracitoplasmático (ce), lignina epitélio (le) e cutícula íntima (cut), seta mostrando grânulos de ácidos lipídicos Barra de escala = 10 μm

A partir das análises histoquímicas foi possível identificar a natureza química dos constituintes celulares presentes em toda estrutura glandular. Os resultados demonstraram que as células secretoras da glândula metapleural são fortemente positivas para lipídios ácidos e totais, indicando que essas células participem na produção de feromônios e de substâncias voláteis, visto que o lipídio é a base molecular das mesmas. Gusmão (2000) estudando a glândula metapleural de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* por meio de microscopia eletrônica de transmissão observou significativa quantidade de retículo endoplasmático liso, o que viria a corroborar sua função de célula sintetizadora de lipídio.

Outros elementos que reagiram com forte positividade no citoplasma das células secretoras da glândula metapleural foram proteínas, glicoproteínas e polissacarídeos ácidos, indicando que estas células produzem estes elementos em grandes quantidades e que, os mesmos devam ter papel importante na constituição da secreção da glândula metapleural.

4.1.4 ANÁLISES QUÍMICAS

Extratos obtidos das diferentes castas das espécies estudadas foram submetidos à análises químicas para identificação e quantificação dos constituintes. Para cada subcasta foram confeccionados três extratos em solventes de diferentes polaridades, hexano, diclorometano e metanol, sendo 30 glândulas em 500 μ L de cada solvente. Os extratos em hexano e diclorometano, contendo substâncias mais voláteis de baixa polaridade, foram analisadas por CG-EM enquanto os extratos em metanol, onde compostos mais polares estavam presentes serão analisadas por CLAE.

4.1.4.1 CG-EM

Os resultados das análises dos voláteis das operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, mostram diferenças quantitativas dos constituintes. Os sinais mais intensos são comuns à todas as castas, havendo diferenças quantitativas, que foram mais ocorrentes principalmente para as operárias médias, Fig.4.9.

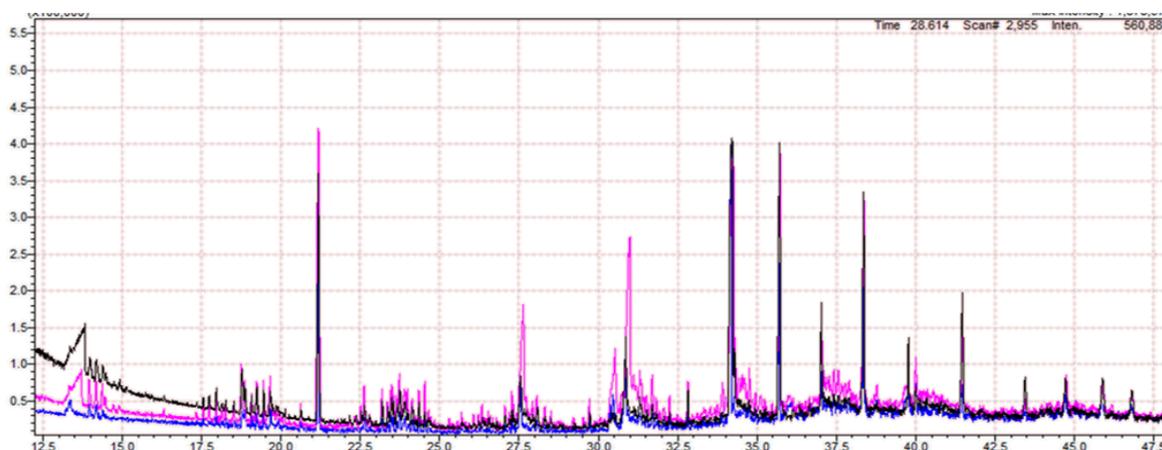


FIGURA 4.9. Cromatograma obtido dos extratos hexânicos de *Atta sexdens rubropilosa*, ---- operárias maiores, ---- operárias médias, ---- operárias mínimas.

Na FIGURA. 4.10 são apresentadas as estruturas sugeridas para as análises de CG-EM. A correlação entre os espectros obtidos e a biblioteca do sistema operacional do cromatógrafo (NIST) foi maior que 90% em todos os casos, o que indica uma boa relação sinal ruído na análise e concordância com a estrutura sugerida. Todas as propostas estruturais são suportadas por mecanismos de

fragmentação coerentes, ou por concordância precisa com fragmentogramas TABELADOS dos respectivos padrões (Adams, 1995).

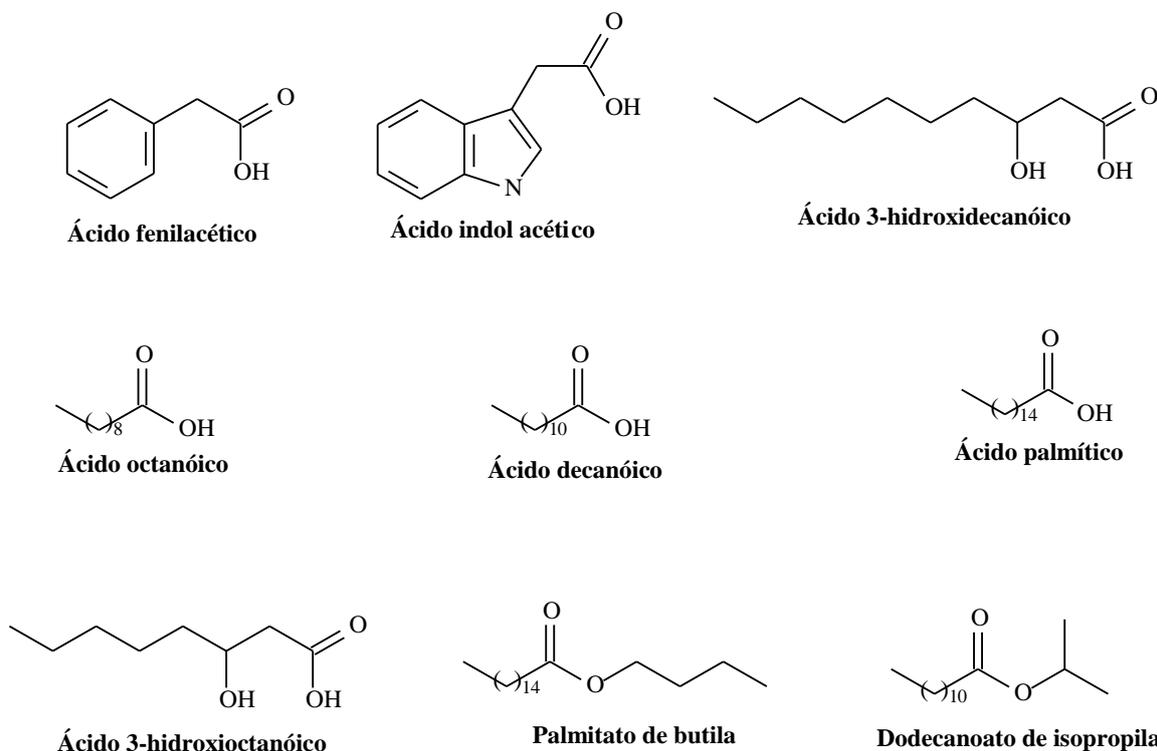


FIGURA 4.10. Estruturas sugeridas para compostos presentes na glândula metapleurar de *Atta sexdens rubropilosa*.

Compostos polares como ácidos carboxílicos, são tradicionalmente convertidos em derivados como metil ésteres para as análises por CG-EM, já que os últimos apresentam maior volatilidade e fragmentação característica, facilitando a identificação estrutural. Contudo, aplicar este tipo de reação a uma mistura de compostos pode levar à perda ou interpretação errônea de dados. No caso da glândula metapleurar, a esterificação da secreção impossibilitaria a identificação dos ésteres que já estão presentes na mesma, uma vez que com a reação e conseqüente conversão de todos os ácidos presentes nela, não seria possível discriminar quais os ésteres estariam atuando como intermediários biossintéticos. Ácidos carboxílicos de cadeia curta são facilmente analisáveis por CG-EM, mesmo com colunas cromatográficas capilares de baixa/média polaridade, em virtude do baixo ponto de ebulição (HAMM et. al., 2005; MORTEZA-SEMNANI et al., 2004, ANDRADE, et al., 2000).

Os ácidos fenilacético, indolacético e β -hidroxiácidos, foram identificados como constituintes da glândula metapleural primeiramente por Nascimento et al. (1996). Com relação aos ácidos indolacético, fenilacético um ponto interessante é a proporção destes entre castas. Ambos são hormônios, no entanto o primeiro é conhecido como a principal auxina das plantas superiores, atuando na regulação do crescimento (TAIZ e ZEIGER, 1998). A aplicação de auxinas em plantas atua induzindo a síntese de auxinas naturais no tecido ou outros hormônios. No entanto, altas doses de auxina podem causar efeito contrário no crescimento e até levar a morte do tecido. A proporção deste composto é muito maior na rainha se comparado as operárias. Já o ácido fenilacético, como auxina, tem baixo efeito no crescimento se comparado ao indolacético (SIMON e PETRÁŠEK, 2011), e não apresenta variação tão acentuada entre as castas. No trabalho publicado em 1971, Schildknecht e Koob mostraram que o ácido fenilacético inibe o crescimento bacteriano no jardim de fungo de *Atta sexdens*, já o ácido indolacético proporcionou o crescimento do fungo simbiote. Assim, a relação entre estes dois compostos pode ser explicada baseando-se em que a maior concentração do o ácido indolacético nas rainhas estaria relacionada ao sucesso na fundação. Uma vez que o fungo simbiote é trazido como micélio somente ele seria capaz de progredir, os outros fungos e/ou bactérias introduzidos como esporos não se desenvolveriam. E a baixa concentração nas operárias pode estar relacionada ao fato de que doses excessivas do ácido indoleico poderiam levar à morte do jardim de fungo.

Os dados da análise química corroboram os obtidos com as análises histoquímicas, ácidos carboxílicos alifáticos de 10-20 átomos de carbono, constituem os ácidos graxos classe de grande importância biológica (McCLOSKEY, 1970), detectados pela técnica do azul de Nilo.

Os ácidos graxos são metabólitos primários, mas também constituem uma fonte de muitos metabólitos secundários. Eles existem, principalmente na natureza como triglicerídeos, FIGURA 4.11, onde três moléculas de ácidos graxos são esterificados a uma molécula de glicerol (MORGAN, 2004). Estes compostos são biosintetizados pelos insetos pela ligação cabeça-cauda, a nova ligação C-C é formada através de uma condensação de Claisen, de unidades de ácido acético. Enquanto as condições reacionais no laboratório para fazer tal

ligação sejam severas, há necessidade de base forte e meio totalmente anidro, Na natureza a mesma reação ocorre em sistema aquoso e pH neutro, em uma série de etapas mediadas por enzimas (TILMAN, et. al., 1999).

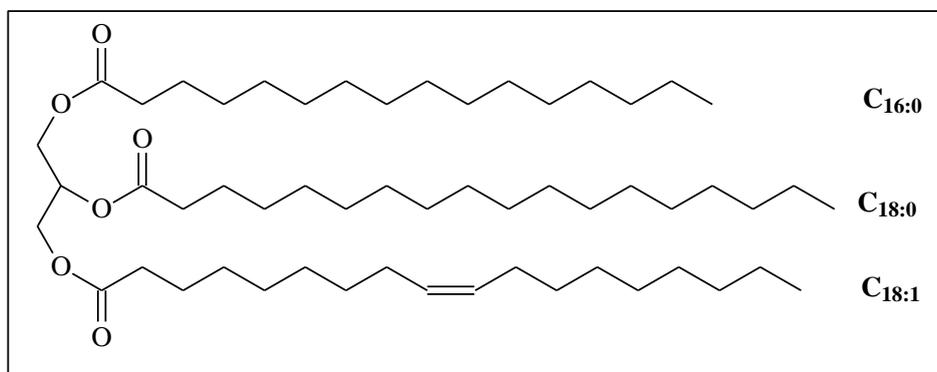


FIGURA 4.11. Exemplo de triglicerídio.

A análise por CG-EM revelou menos compostos para os soldados de *Acromyrmex rogosus* e a espécie *Trachymyrmex fuscus*, Figs 4.12 e 4.13

Para de *Acromyrmex rogosus* os sinais mais intensos correspondem ao dodecanoato de isopropila, ácido palmítico e alguns hidrocarbonetos saturados de cadeia aberta. O aumento da cadeia de hidrocarbonetos torna o perfil de fragmentação destes compostos muito semelhantes e nem sempre o íon molecular está presente, assim a correta determinação estrutural deve ser feita pela comparação com tempo de retenção de padrões (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

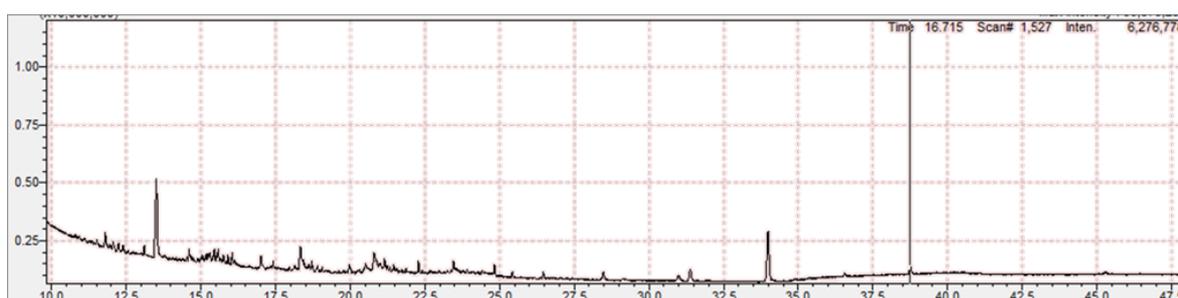


FIGURA 4.12. Cromatograma obtido dos extratos hexânicos de *Acromyrmex rogosus*.

Hidrocarbonetos cuticulares têm função de formar o odor colonial, que é a assinatura química da colônia. Estes também podem auxiliar na proteção pois há relatos de atividade antimicrobiana já que não são facilmente digeridos por muitos microorganismos (BAGNERES e MORGAN, 1991).

O cromatograma da espécie *Trachymyrmex fuscus* também apresentou poucos sinais, as estruturas sugeridas são expostas na Fig.4.14, e evidenciam a presença de triglicerídeos.

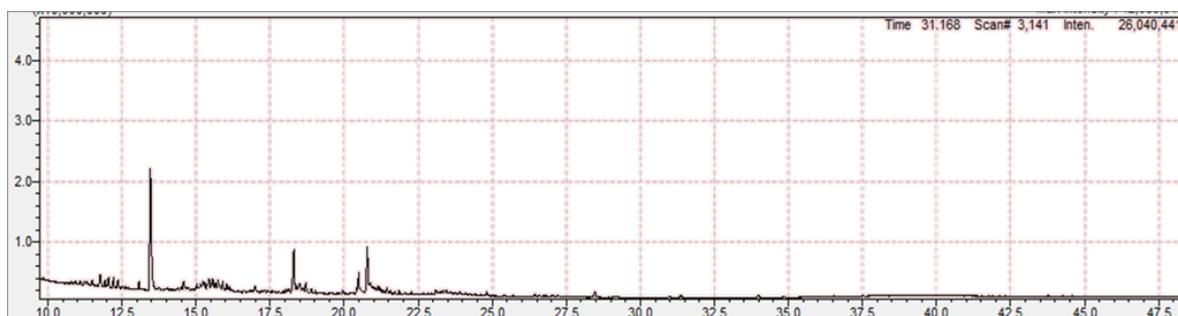


FIGURA 4.13. Cromatograma obtido dos extratos hexânicos de *Trachymyrmex fuscus*.

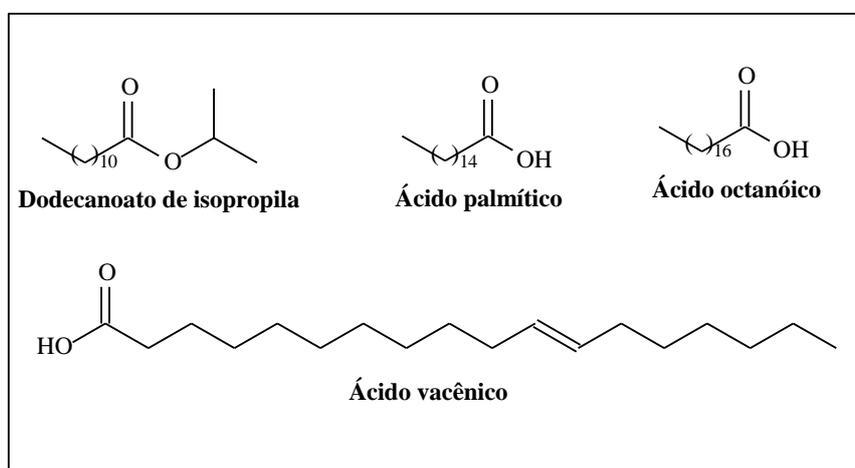


FIGURA 4.14. Estruturas sugeridas para compostos presentes na glândula metapleural de *Trachymyrmex fuscus*.

Os extratos da glândula metapleural destas três espécies, bem como para *Atta bisphaerica* e *Acromyrmex balzanii*, serão submetidos a análises mais detalhadas dos compostos minoritários assim como a análise da fração mais polar para todas as espécies. Contudo os resultados preliminares já demonstram a importância da glândula metapleural para o sucesso evolutivo das attines. Dentro do grupo, as formigas pertencentes ao gênero *Atta* são mais derivadas. É estimado que suas colônias tenham milhões de indivíduos, e para manter uma colônia deste porte o mecanismo de assepsia tem que ser muito eficiente (FOWLER et al, 1986; VEAL et al, 1992). Os mecanismos de defesa são dinâmicos e foram se moldando ao longo da evolução. Fazendo uma comparação quantitativa entre o número de

compostos presentes na glândula metapleural das três espécies até agora analisadas, para *Atta sexdens rubropilosa* o maior número de compostos pode estar relacionado ao sucesso desta espécie. Uma vez que relatos na literatura mostram que o efeito sinérgico dos compostos (BOT et al, 2002; MENDONÇA et al, 2009) presentes na glândula metapleural é fundamental na supressão de microorganismos, o maior número de compostos dificultaria a habituação e resistência de patógenos.

4.1.4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A fim de otimizar as condições de extração, foi validado o método cromatográfico para análise dos constituintes da glândula metapleural.

a) Linearidade e Sensibilidade

A maior dificuldade na quantificação e qualificação dos compostos está nas diminutas concentrações dos mesmos nas glândulas. Desta forma é necessário estimar o número de glândulas a serem extraídas para que estas determinações sejam corretas. Este número é dependente da espécie e dos indivíduos pertencentes às diferentes castas. Na TABELA 4.6, estão discriminados os números de glândulas necessários para se obter um comportamento cromatográfico bastante similar dos constituintes entre as espécies, FIGURA 4.15

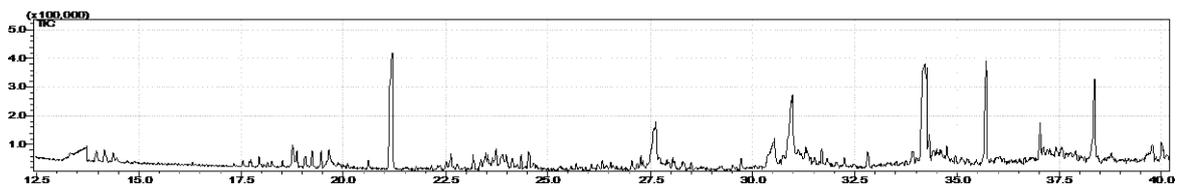
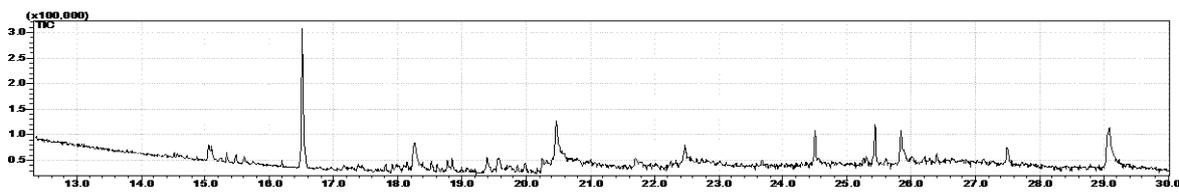
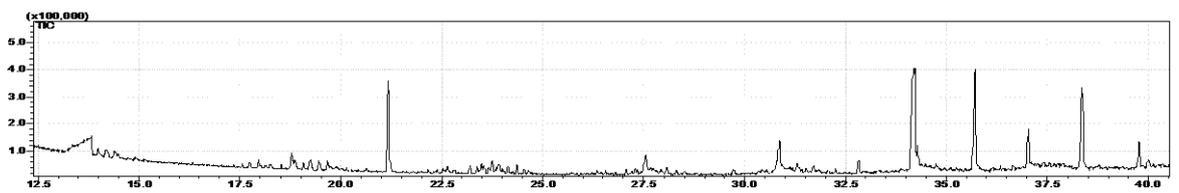
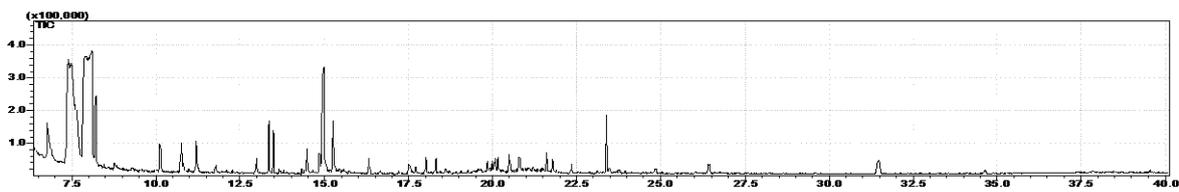
TABELA 4.6. Número de glândulas metapleurais necessárias para quantificação e qualificação dos constituintes nas diferentes espécies e diferentes castas.

Espécie	Casta	Número de glândulas
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Rainha	6
	Soldado	10
	Operária média	20
	Operária mínima	50
<i>Atta bisphaerica</i>	Rainha	6
	Soldado	10
	Operária média	20
	Operária mínima	50
<i>Acromyrmex balzanii</i>	Rainha	10
	Soldado	20
	Operária média	30
	Operária mínima	60
<i>Acromyrmex rogosus</i>	Soldado	20
	Operária média	30
	Operária mínima	60
<i>Trachymyrmex fuscus</i> *	Operária	40
<i>Mycocetarotes sp.</i> *	Operária	60

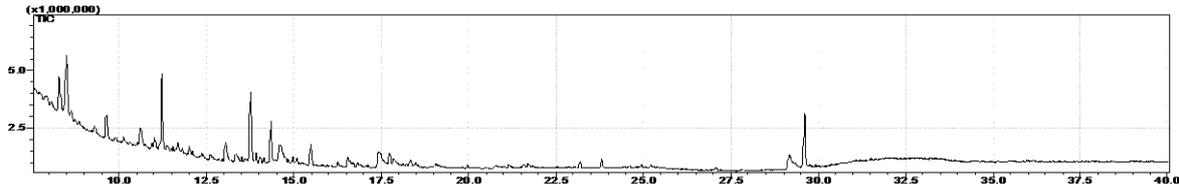
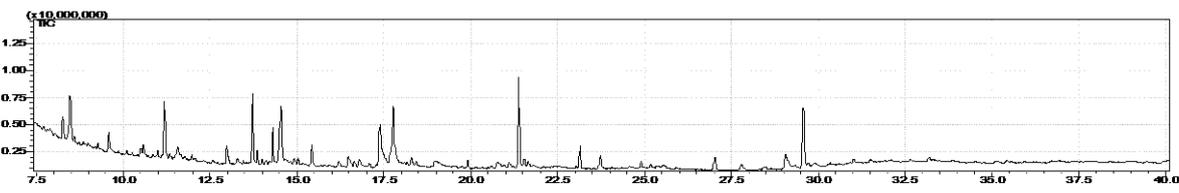
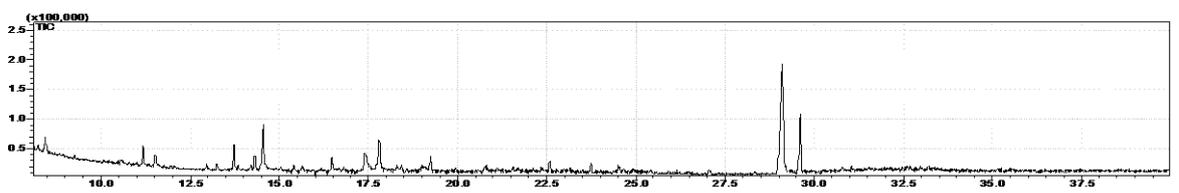
*monomórficas

Quando a faixa de concentração é muito baixa (1–5 ng/mL), observa-se uma diminuição na intensidade do sinal cromatográfico. No entanto, à medida que a concentração dos analitos aumenta, a intensidade dos picos aumenta significativamente. Esse aumento é linear para uma ampla faixa de concentração, aproximadamente 50 a 1000 ng/mL. Para concentrações mais elevadas (acima de 1000 ng/mL a intensidade dos sinais apresenta um aumento bastante discreto. Essa queda na linearidade sugere que tais concentrações já estariam extrapolando a faixa ótima de trabalho para os analitos em questão.

Atta sexdens rubropilosa



Atta bisphaerica



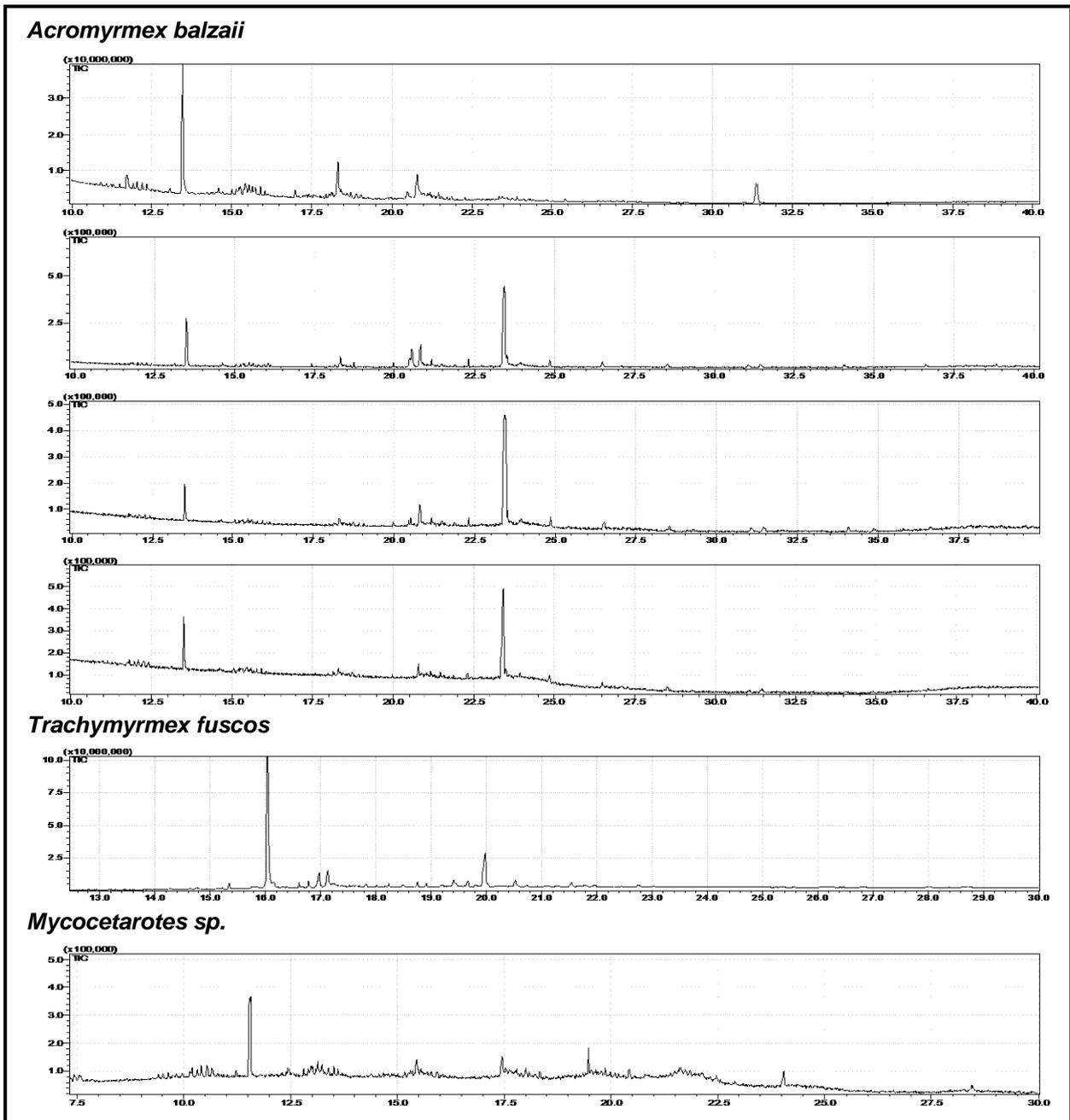


FIGURA 4.15. Cromatograma de íons totais obtidos para as espécies de *attini* analisadas.

Além disso, trabalhar com concentração na ordem de ppm como modo de injeção splitless pode não ser muito aconselhável, principalmente quando se trata de matrizes complexas como extrato glandular. Um dos principais motivos para isso é o aparecimento de um efeito memória, devido a um acúmulo de material proveniente da matriz, que ocorre principalmente no injetor do equipamento. Quando há muito

material acumulado no injetor, a entrada dos analitos na coluna cromatográfica fica comprometida, levando à perda de resposta nas análises, que por sua vez terão de ser interrompidas para uma manutenção no equipamento.

Nas análises em matrizes biológicas, para um método quantitativo apresentar boa linearidade, é necessário que o valor do coeficiente de correlação (R^2) seja superior a 0,99 (HARTMANN, 1998). Nesse trabalho, os valores obtidos para esses coeficientes são muito superiores a esse mínimo, indicando que os modelos lineares estão bem ajustados, TABELA 4.7.

O método aqui desenvolvido apresentou uma ampla faixa linear para todos os analitos estudados.

TABELA 4.7. Linearidade e Sensibilidade para os padrões em estudo.

Padrão	Linearidade	Equação de ajuste	R ²	LD (ng)	LQ (ng)
Ácido Octanóico	10-2000	$y=(0.00408\pm 0.0001)x + (0.95\pm 0.05)$	0.99777	1.14	3.45
Ácido Decanoico	10-2000	$y=(0.00152\pm 0.00004)x + (0.50\pm 0.02)$	0.99827	1.05	3.19
Ácido Dodecanóico	10-2000	$y=(0.00455\pm 0.00007)x - (0.07\pm 0.03)$	0.99896	1.45	4.17
Ácido Tetradecanóico	10-2000	$y=(0.00258\pm 0.00005)x + (0.54\pm 0.02)$	0.99828	1.01	3.05
Ácido Hexadecanóico	10-2000	$y=(0.00087\pm 0.00001)x + (0.3\pm 0.01)$	0.99928	1.33	3.60
Ácido (±)-3-Hidroxidecanóico	10-2000	$y=(0.044\pm 0.001)x - (1.4\pm 0.5)$	0.99712	1.01	3.04
Ácido (±)-3-Hidroxiocanóico	10-2000	$y=(0,00459\pm 0,00004)x + (0,11\pm 0,03)$	0,99955	1.41	3.37
Ácido Mirístico	10-2000	$y=(0.00465\pm 0.00005)x + (0.06\pm 0.04)$	0.99923	2.23	7.45
Ácido Indol-Acético	10-2000	$y=(0.00099\pm 0.00006)x - (0.17\pm 0.02)$	0.99826	1.89	5.99
Ácido Fenil-Acético	10-2000	$y=(0.00368\pm 0.00003)x + (0.46\pm 0.03)$	0.99934	1.98	6.01
Estearato De Butila	10-2000	$y=(0.00107\pm 0.00001)x + (0.33\pm 0.01)$	0.99812	2.04	6.20
Palmitato De Isopropila	10-2000	$y=(0.00804\pm 0.0008)x + (1.95\pm 0.03)$	0,99854	2.08	6.33

A sensibilidade do método foi avaliada, baseando-se nos valores de Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) calculados a partir das análises realizadas com as amostras de referência negativa. Em relação a esse parâmetro, pode-se se dizer que o método apresentou uma sensibilidade muito boa para todos os analitos estudados.

Nas TABELAS 4.8 a 4.11 são expostas a concentração encontrada dos principais constituintes na glândula metapleural das espécies em estudo.

Como observado não há um perfil dos compostos da glândula metapleural comum às espécies. Em revisão recente Yek e Mueller (2008) também verificaram

que são poucos os compostos compartilhados entre as espécies de *attinis*. Os constituintes de maior concentração comum a todas são os ácidos: indol acético, fenil acético, 3-hidroxicaproico e 3-hidroxiocaproico. Outra surpresa é a variação entre indivíduos de castas distintas, porém uma mesma espécie. Um próximo passo importante do projeto é a realização dos ensaios de atividade biológica, onde serão testados os extratos obtidos, das diferentes espécies e castas, frente a microorganismos patogênicos das formigas cortadeiras, assim como padrões sintéticos. Tais ensaios podem revelar a maior importância de composto(s) na supressão de microorganismos. É de conhecimento que o efeito sinérgico apresenta grande importância nestes casos, contudo os resultados podem ser reveladores, visto a diferença quantitativa observada entre os indivíduos de mesma espécie e castas diferentes.

TABELA 4.8. Massas dos compostos presentes em *Atta sexdens rubropilosa*

Composto	Casta*			
	Rainha	Soldado	Operária média	Operária mínima
Ácido octanoico	49,06 ± 11,2	10,03 ± 3,7	5,77 ± 3,00	2,04 ± 1,04
Ácido decanoico	63,56 ± 23,1	45,71 ± 6,91	30,09 ± 9,93	17,02 ± 7,39
Ácido palmítico	6,07 ± 11,5	t	t	t
Decanoato de isopropila	21,49 ± 9,76	t	t	t
Ácido 3-hidroxicaproico	19,73 ± 10,70	7,85 ± 2,33	5,32 ± 2,01	2,00 ± 1,23
Ácido 3-hidroxiocaproico	16,37 ± 7,5	11,03 ± 5,12	4,32 ± 1,91	2,01 ± 1,00
Ácido 3-hidroxicaproico	5,07 ± 4,5	t	t	t
Ácido fenilacético	81,05 ± 22,60	29,11 ± 10,55	37,04	22,03 ± 10,93
Ácido indolacético	93,81 ± 14,54	17,01 ± 14,98	33,28	27,66 ± 6,92
Escatol	10,10 ± 4,3	3,03 ± 1,20	t	t
Palmitato de etila	22,60 ± 14,04	6,67 ± 2,09	3,10 ± 1,34	t
Ácido oleico	10,09 ± 8,12	2,99 ± 1,60	t	t

* N= 30 indivíduos e massa em ng

TABELA 4.9. Massas dos compostos presentes em *Atta bisphaerica*.

Composto	Casta*			
	Rainha	Soldado	Operária média	Operária mínima
Ácido octanóico	22,45±10,44	6,4±3,0	1,9±0,8	0,9±0,4
Ácido decanóico	19,43±9,88	22,34±9,78	13,67±9,04	5,88±4,7
Ácido palmítico	90,76±17,55	29,45±11,02	13,87±4,5	8,00±2,47
Decanoato de isopropila	14,59 ± 7,81	t	t	t
Ácido 3-hidroxi-decanóico	22,33±10,92	21,38±6,73	11,02±5,67	3,01±1,22
Ácido 3-hidroxi-octanóico	200,33±25,50	90,9±35,8	55,8±13,6	t
Ácido 3-hidroxi-dodecanóico	50,45±18,99	20,9±35,8	8,8±3,6	2,3 ± 0,9
Ácido fenilacético	443,5±238,4	253,5±238,4	128,2±93,4	38,4±32,5
Ácido indolacético	88,62±23,66	46,8±13,5	24,1±10,1	7,6±1,7
Escatol	300,45±22,33	172,3±269,6	83,1±126,4	37,0±21,9
Palmitato de etila	50,01±16,77	28,1±12,6	13,5±3,6	6,4±2,0
Ácido oleico	83,93±12,66	42,7±28,5	2,1±1,1	2,8±2,2

TABELA 4.10. Massas dos compostos presentes em *Acromyrmex rogosus*.

Composto	Casta*			
	Rainha	Soldado	Operária média	Operária mínima
Ácido palmítico	20,76±17,55	8,49±6,02	6,87±2,5	3,00±1,47
Decanoato de isopropila	4,79 ± 3,81	t	T	t
Ácido 3-hidroxi-hexanóico	28,33±10,92	11,38±6,73	9,02±4,45	4,01±1,22
Ácido 3-hidroxi-octanóico	22,33±15,50	10,9±5,8	55,8±13,6	t
Ácido indolacético	9,62±6,68	6,8±3,5	4,1±2,1	t
Escatol	100,45±24,36	33,3±12,6	13,1±126,4	4,0±21,7
Palmitato de etila	22,01±8,77	8,1±5,6	7,5±3,6	2,4±2,5
Ácido oleico	13,93±6,56	9,7±5,5	2,1±1,1	2,8±2,3

TABELA 4.11. Massas dos compostos presentes em *Acromyrmex balzanii*.

Composto	Casta*			
	Rainha	Soldado	Operária média	Operária mínima
Ácido palmítico	24,76±7,88	6,49±4,04	6,87±2,5	2,05±1,11
Decanoato de isopropila	5,96 ± 3,81	t	t	t
Ácido 3-hidroxihexanóico	16,33±8,96	9,38±6,75	4,02±4,45	1,01±0,9
Ácido 3-hidroxiocetanóico	20,763±11,47	7,9±5,86	6,8±13,6	t
Ácido indolacético	8,62±6,78	3,8±3,58	1,1±0,9	t
Escatol	90,77±34,36	21,3±12,61	8,1±126,4	2,8±2,70
Palmitato de etila	21,01±11,01	7,1±5,63	6,5±3,6	1,5±0,9
Ácido oleico	15,73±5,44	6,7±5,08	2,1±1,1	1,5±0,9

TABELA 4.12. Massas dos compostos presentes em *Trachymyrmex fuscus*.

Composto	Casta*			
	Rainha	Soldado	Operária média	Operária mínima
Ácido palmítico	18,76±8,00	5,49±4,04	6,87±2,5	2,05±1,11
Ácido 3-hidroxihexanóico	673±8,06	4,58±6,75	4,12±3,5	3,08±1,7
Ácido 3-hidroxiocetanóico	10,70±13,47	9,8±5,00	5,8±3,6	1,09 ±1,9
Ácido indolacético	6,24±6,80	4,1±3,58	2,3±1,6	2,7 ±1,7
Palmitato de etila	18,09±12,01	5,1±3,03	8,4±2,6	2,3±0,8
Ácido oleico	16,77±7,84	5,5±2,8	2,2±1,1	2,5±1,0

b) Precisão Intra-dia e Precisão Inter-dia

A precisão intra-dia está relacionada principalmente com o cuidado no preparo das amostras e com a estabilidade do equipamento. Os resultados apresentados na TABELA 4.12 indicam uma precisão intra-dia média superior a 95% (CV inferior a 5%), o que é bastante satisfatório para análises realizadas em matrizes biológicas. Isso sugere que as amostras foram cuidadosamente preparadas, minimizando o erro experimental. A precisão inter-dia reflete a variabilidade de um método de um dia para outro. Por isso, está associada com a preparação das amostras de a flutuação da resposta do equipamento.

Nesse estudo, o método também apresentou uma precisão inter-dia média de 95% , TABELA 12. Uma variação de aproximadamente 5% no inter-ensaio para análises biológicas é considerada muito baixa (até 10% é aceitável) e está associada ao erro sistemático.

TABELA 12. Precisões intra-dia e inter-dia para os extratos glandulares das espécies em estudo.

Analitos (constituintes glandulares)	Concentração (n° glândulas)	Precisão Intra-dia (%CV)	Precisão Inter-dia (%CV)
	10	5.87	3.15
Ácido Octanóico	20	3.44	2.94
	50	2.51	2.99
	10	4.02	4.05
Ácido Decanoico	20	4.67	4.89
	50	3.94	4.23
	10	2.94	4.81
Ácido Dodecanóico	20	3.65	3.99
	50	2.90	3.94
	10	3.56	3.84
Ácido Tetradecanóico	20	4.57	2.45
	50	4.10	2.59
	10	2.34	4.92
Ácido Hexadecanóico	20	4.59	3.95
	50	3.55	4.86
	10	3.67	3.95
Ácido (±)-3-Hidroxidecanóico	20	3.95	3.95
	50	3.02	2.99
	10	2.68	2.84
Ácido (±)-3-Hidroxiocetanóico	20	2.94	1.56
	50	3.05	2.93
	10	2.94	2.93
Ácido Mirístico	20	3.91	2.88
	50	3.94	3.65
	10	4.06	3.13
Ácido Indol-Acético	20	4.02	3.95
	50	4.44	3.04
	10	4.32	3.47
Ácido Fenil-Acético	20	4.67	4.58
	50	4.85	4.10
	10	4.81	3.56
Estearato De Butila	20	3.56	3.61
	50	3.95	3.04
	10	4.20	3.69
Palmitato De Isopropila	20	4.07	4.33
	50	3.95	4.27

c) Estabilidade da amostra (congelamento / descongelamento)

No estudo de estabilidade da amostra, observou-se que, após o primeiro e segundo ciclos de descongelamento das amostras, não houve uma redução significativa na concentração dos analitos. Após o terceiro descongelamentos, houve maior variação.

Embora tenha ocorrido uma redução significativa na concentração dos analitos ao final do ensaio, observa-se que tal variação encontra-se dentro do limite aceitável de trabalho (inferior a 20%) (HARTMANN, 1998). Portanto, pode-se dizer que mesmo quando as amostras já foram congeladas mais de uma vez, ainda é possível realizar as análises, embora esse não seja o procedimento mais aconselhável.

4.1.4.3. RESULTADOS DE RMN

Os extratos ainda foram submetidos à ressonância magnética nuclear de duas formas: pelo extrato da glândula em solvente deuterado e por HR-MAS. A última se difere do RMN normal pois tem como princípio base de que materiais (animais ou vegetais) possuem moléculas de água em suas células que proporcionam a mobilidade dos metabólitos primários e secundários, permitindo a obtenção de espectros com resolução adequada. As glândulas foram diretamente inseridas no rotor com volume de 50 μL . A geometria interna esférica do rotor aliada ao giro segundo o ângulo mágico de $54,74^\circ$, com uma rotação elevada, nos permite obter espectros de hidrogênio com a resolução similar ao de um espectro em solução. Como mostrado na FIGURA 8 os espectros de H^1 para as duas técnicas é semelhante, contudo é necessário um número menor de glândulas para obtenção de espectro com mesma resolução.

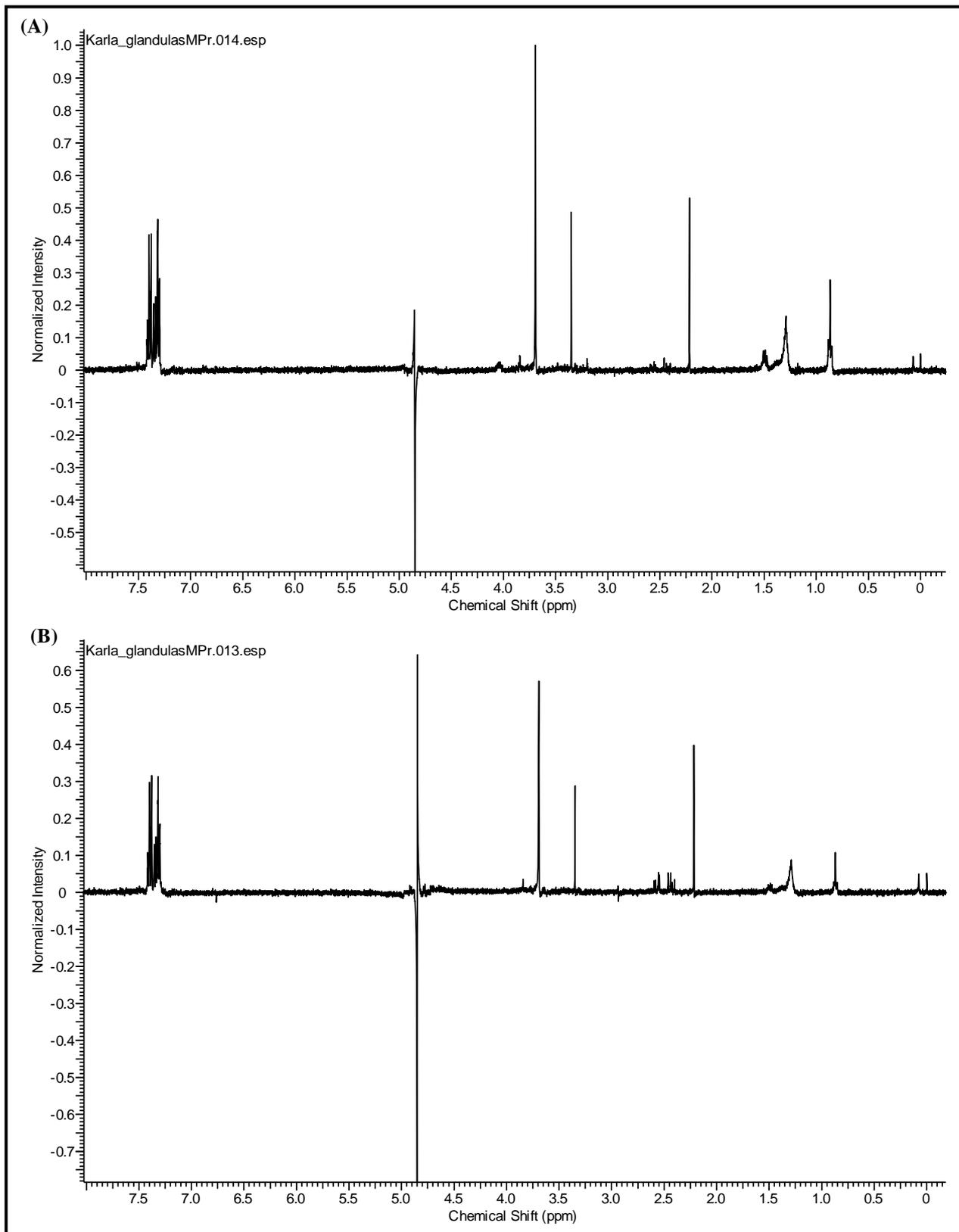


FIGURA 4.16. Espectros de H^1 obtidos pelo modo tradicional (A) e por HR-MAS (B) para rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*.

Os espectros de RMN, para análise da matriz biológica como um todo, fornecem informações úteis para elucidação estrutural com número e ambiente químico que se encontra o átomo de H¹, por exemplo, é clara a presença de hidrogênios aromáticos na região na região de 7.4ppm. Ainda são observados os hidrogênios na região de 10,9 ppm característicos de ácidos carboxílicos. Estes hidrogênios são fortemente desblindados em função do efeito da anisotropia diamagnética do anel aromático. Contudo, com nas análises por CG-EM, são obtidos os espectros de massa de cada sinal cromatográfico, permitindo qualificação individual, que constitui o objetivo deste trabalho. O perfil observado nos espectros de RMN foi semelhante para todas as espécies analisadas.

4.1.5. MICROORGANISMOS ISOLADOS E ENSAIOS BIOLÓGICOS

Foram isolados do jardim do fungo simbiote *Escovopsis weberi*, *Fusarium sp.*, *Cunninganella sp.*, *Beauveria bassiana*. Estes constituem os principais fungos endopatogêneos nos jardins das formigas cortadeiras. Os principais compostos isolados da glândula metapleural foram testado contra os patógenos. Os resultados são apresentados nos gráficos das FIGURA 4.17 a 4.20.

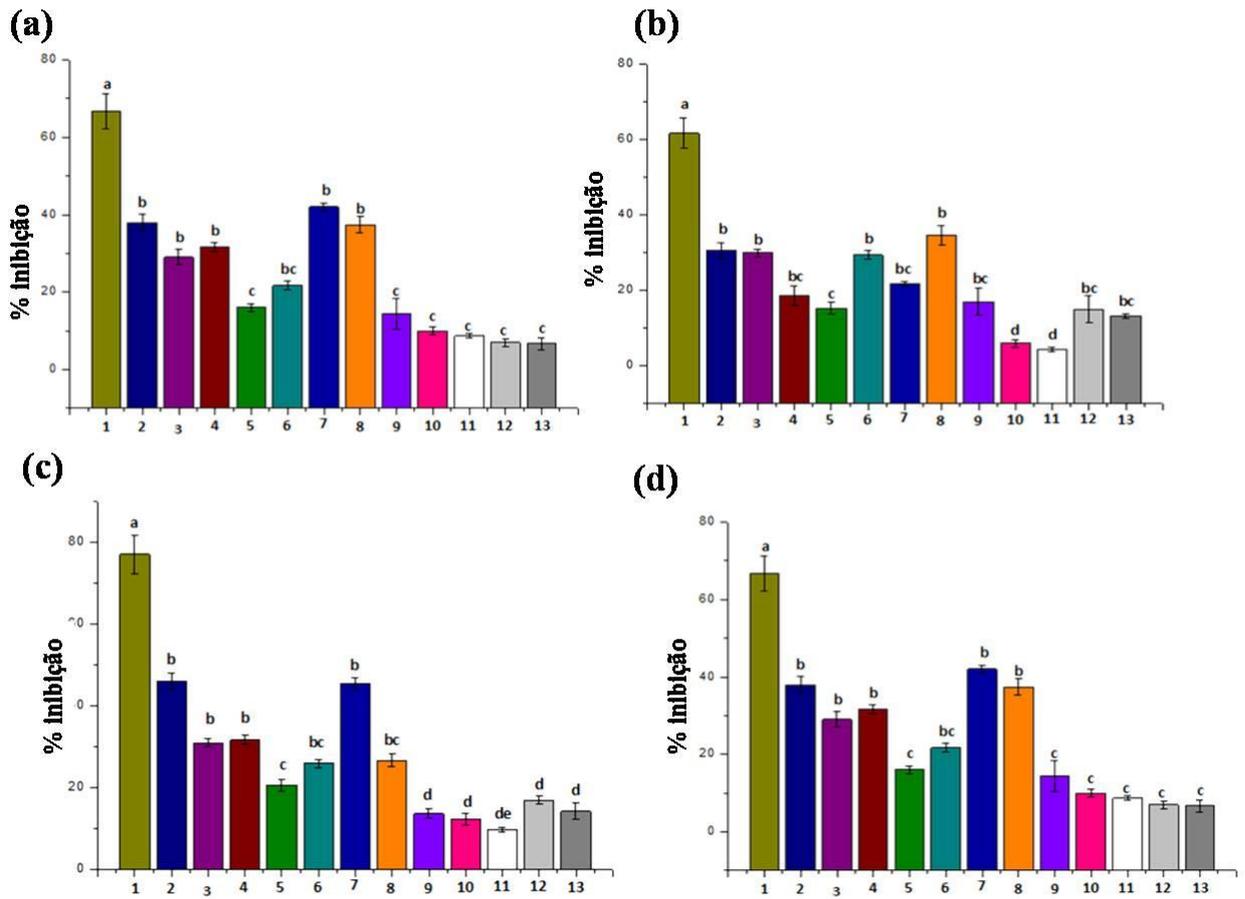


FIGURA 4.17. Microorganismos isolados de *Atta sexdens rubropilosa* (a) *Escovopsis weberi* (b) *Fusarium sp.* (c) *Cunninghamella sp.* (d) *Beauveria bassiana*. 1- Extrato glandular; 2- ácido octanóico; 2- ácido decanóico, 3- ácido dodecanóico, 5- ácido mirístico; 6- ácido palmítico; 7- ácido 3-hidroxidodecanóico, 8- ácido 3-hidroxi-decanóico; 9-; 10- ácido indol acético; 11- ácido fenil acético; 12- palmitato de butila; 13- dodecanoato de isopropila.

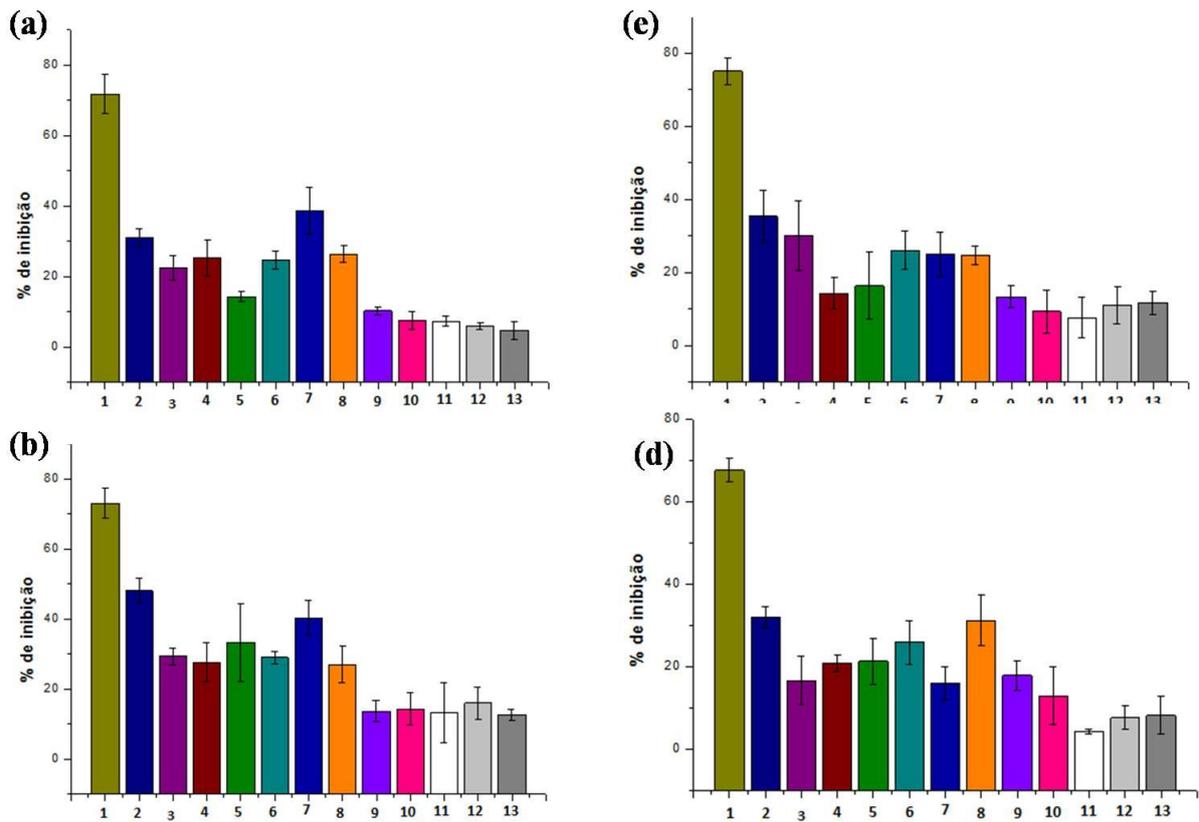


FIGURA 4.18. Microorganismos isolados de *Atta bisphaerica* (a) *Escovopsis weberi* (b) *Fusarium sp.* (c) *Cunninghamella sp.* (d) *Beauveria bassiana*. 1- Extrato glandular; 2- ácido octanóico; 2- ácido decanóico, 3- ácido dodecanóico, 5- ácido mirístico; 6-ácido palmítico; 7- ácido 3-hidroxi-dodecanóico, 8- ácido 3-hidroxi-decanóico; 9-; 10- ácido indol acético; 11- ácido fenil acético; 12- palmitato de butila; 13- dodecanoato de isopropila.

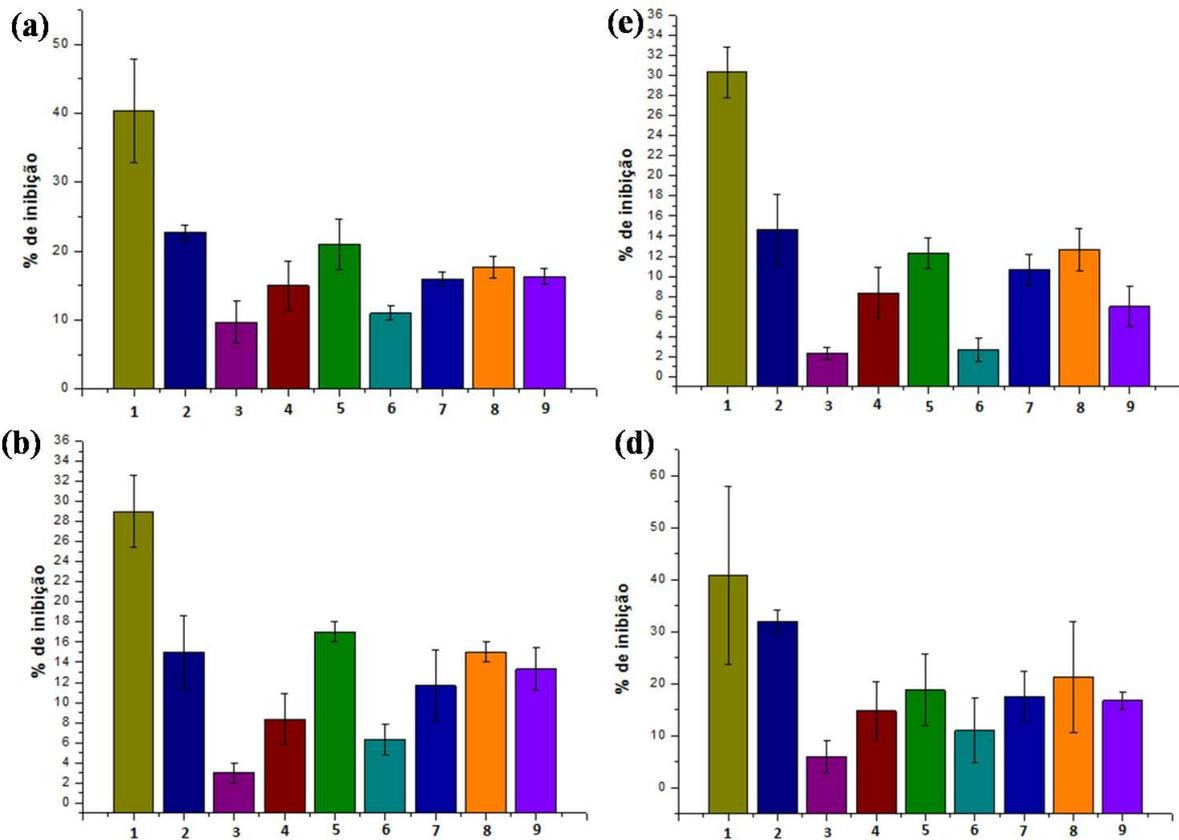


FIGURA 4.19. Microorganismos isolados de *Acromyrmex rogosus* (a) *Escovopsis weberi* (b) *Fusarium sp.* (c) *Cunninghamella sp.* (d) *Beauveria bassiana*. 1- Extrato glandular; 2- ácido palmítico; 3- dodecanoato de isopropila, 4- ácido 3-hidroxihexanóico, 5- ácido 3-hidroxiocetáico; 6- ácido indolacético; 7- escatol; 8- palmitato de butila; 9- ácido oléico.

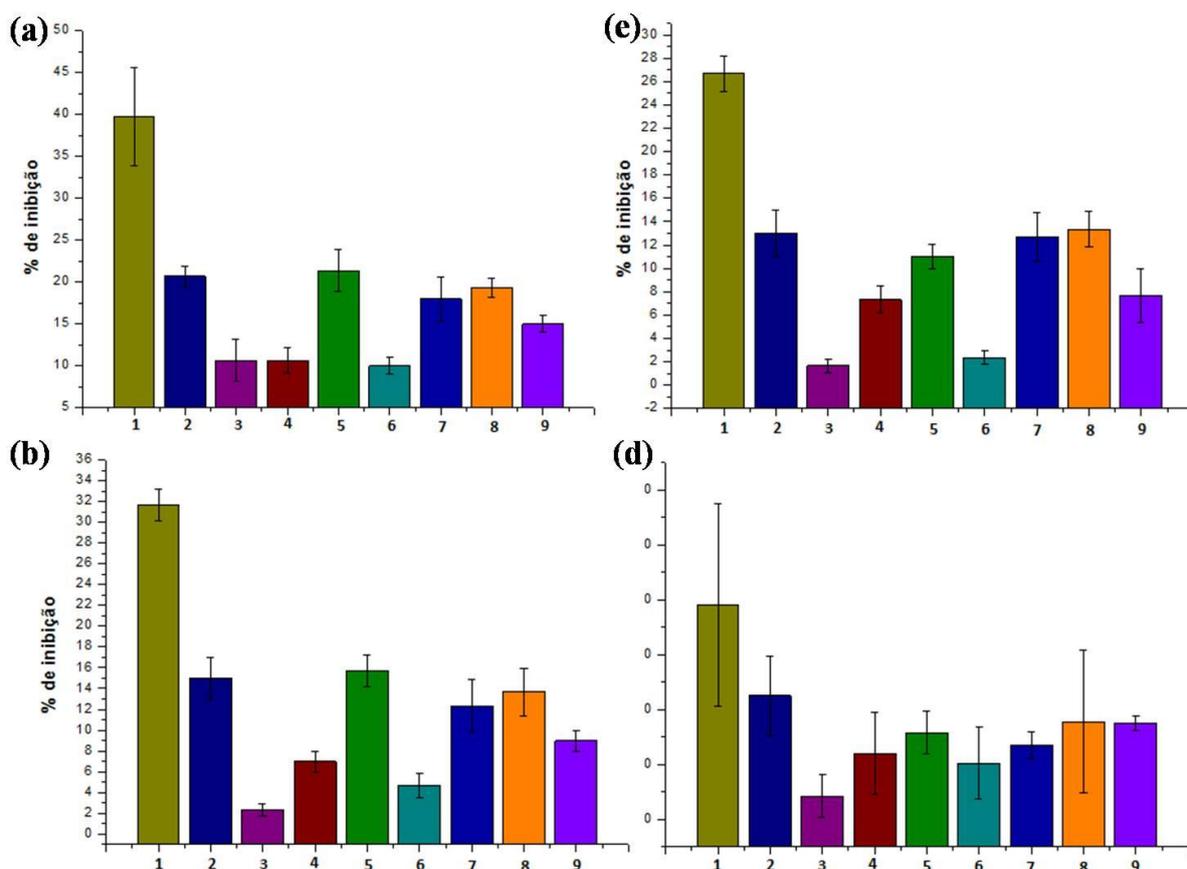


FIGURA 4.20. Microorganismos isolados de *Acromyrmex balzanii* (a) *Escovopsis weberi* (b) *Fusarium sp.* (c) *Cunninghamella sp.* (d) *Beauveria bassiana*. 1- Extrato glandular; 2- ácido palmítico; 3- dodecanoato de isopropila, 4- ácido 3-hidroxihexanóico, 5- ácido 3-hidroxiocetanóico; 6- ácido indolacético; 7- escatol; 8- palmitato de butila; 9- ácido oléico.

Os ensaios biológicos foram realizados tendo como parâmetro a concentração dos compostos presentes nas glândulas metapleurais das rainhas. Foi observado que todos os compostos apresentaram atividade frente aos microorganismos testados. Sendo que nenhum deles foi superior ao extrato, o que pode ser explicado pelo sinergismo das substâncias presentes no extrato.

Os ensaios de inibição evidenciaram a importância da secreção da glândula metapleural para manutenção da assepsia das colônias de formigas cortadeiras. Os metabólitos secundários secretados exercem papel primordial para desenvolvimento

das colônias, o que fica claro nas análises quanti e qualitativas. O número e concentração de compostos secretados pelas glândulas são maiores entre as *Attinis* mais evoluídas do gênero *Atta*. A secreção é composta principalmente por ácidos e hidroxiácidos, que tornam o pH dos ninhos ácidos. Este também é um importante aspecto na assepsia, os microorganismos patogênicos proliferam-se mais rapidamente em meio básico. O *Escovopsis*, por exemplo, tem porcentagem de germinação de aproximadamente 5% em pH abaixo de 7, já em meio básico, esta sobe para 52% (FOWLER et al., 1986).

Há vários relatos na literatura de que ácidos carboxílicos de cadeia média e longa, são tóxicos para as colônias, não somente às formigas mas também para o fungo simbiote, em concentrações na ordem de miligramas. Assim fica evidente a importância da concentração destes compostos, que podem ser tóxicos ou não. O mesmo é observado com o antibiótico secretado pela *Pseudonocardia*, o candicidin D. O trabalho realizado por Sen e colaboradores (2009) mostrou que em determinadas concentrações o candicidin D era tóxico ao fungo simbiote, colocando em dúvida o papel mutualístico da *Pseudonocardia*.

4.2. A GLÂNDULA LABIAL

4.2.1 HISTOLOGIA

Caetano (2002) descreve a glândula labial como sendo:

“*uma porção secretora localizada no protórax e no mesotórax, apresentando-se como duas massas frouxas de células secretoras ligadas (CS) por canáliculos (seta) que se unem e vão aumentando de calibre até um reservatório (R) - nem sempre presente- do qual parte um ducto excretor lateral (d) cujos ramos esquerdo e direito fundem-se antes de entrar na cabeça. Na cabeça este ramo único vai desembocar passando próximo às glândulas hipofaríngeas.*”

Esta foi a morfologia encontrada para todas as espécies analisadas, Fig. 4.21. O ducto termina na cavidade oral (glossa) onde a secreção será liberada (LANDOLT e AKRE, 1979).

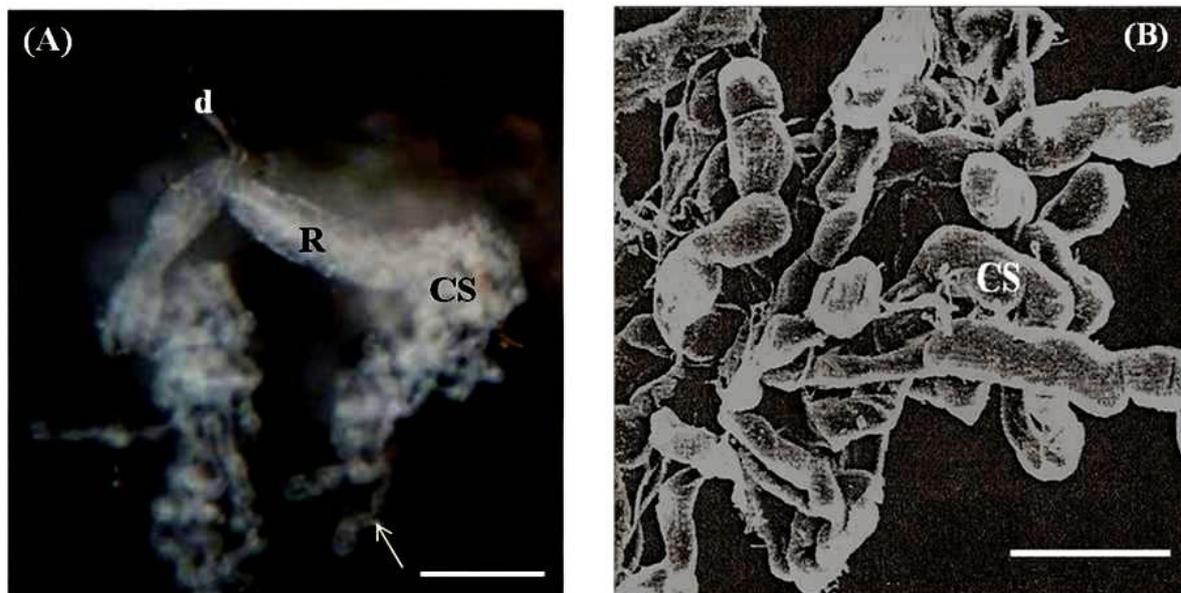


FIGURA 4.21. Glândula labial de operária de *Atta sexdens rubripilosa*, **(A)** Microscopia de luz mostrando as principais porções descritas por Caetano (2000), células secretoras (CS), reservatório (R), ducto (d) e canáliculo (seta), barra de escala 50 μm . **(B)** detalhe da superfície com microscopia eletrônica de varredura das células secretoras, barra de escala 10 μm .

Na ordem Hymenoptera a porção secretora da glândula salivar do tórax pode ser formada por estruturas alveolares, pseudotubulares e tubulares, sendo

constituídas por células epiteliais, revestidas internamente por cutícula (Cruz-Landim e Saenz, 1972). Para as espécies de attines analisadas observou-se as formas tubulares e pseudotubulares, FIGURA. 4.21.(B).

4.2.2 TÉCNICA HEMATOXILINA DE HARRIS

Assim como para a glândula metapleurálica, a morfologia apresentada pela glândula labial é semelhante entre as cinco espécies estudadas, e também não foi observada distinção que não fossem relacionadas ao tamanho entre as castas, Fig. 4.22. A diferenciação ocorre quanto a presença ou ausência do reservatório. As espécies de *Atta* apresentam dilatação dos ductos laterais, que desta forma atuam como reservatório (GAMA e CRUZ-LANDIM, 1982). Para *Acromyrmex* e principalmente *Trachymyrmex*, a dilatação não é tão evidente.

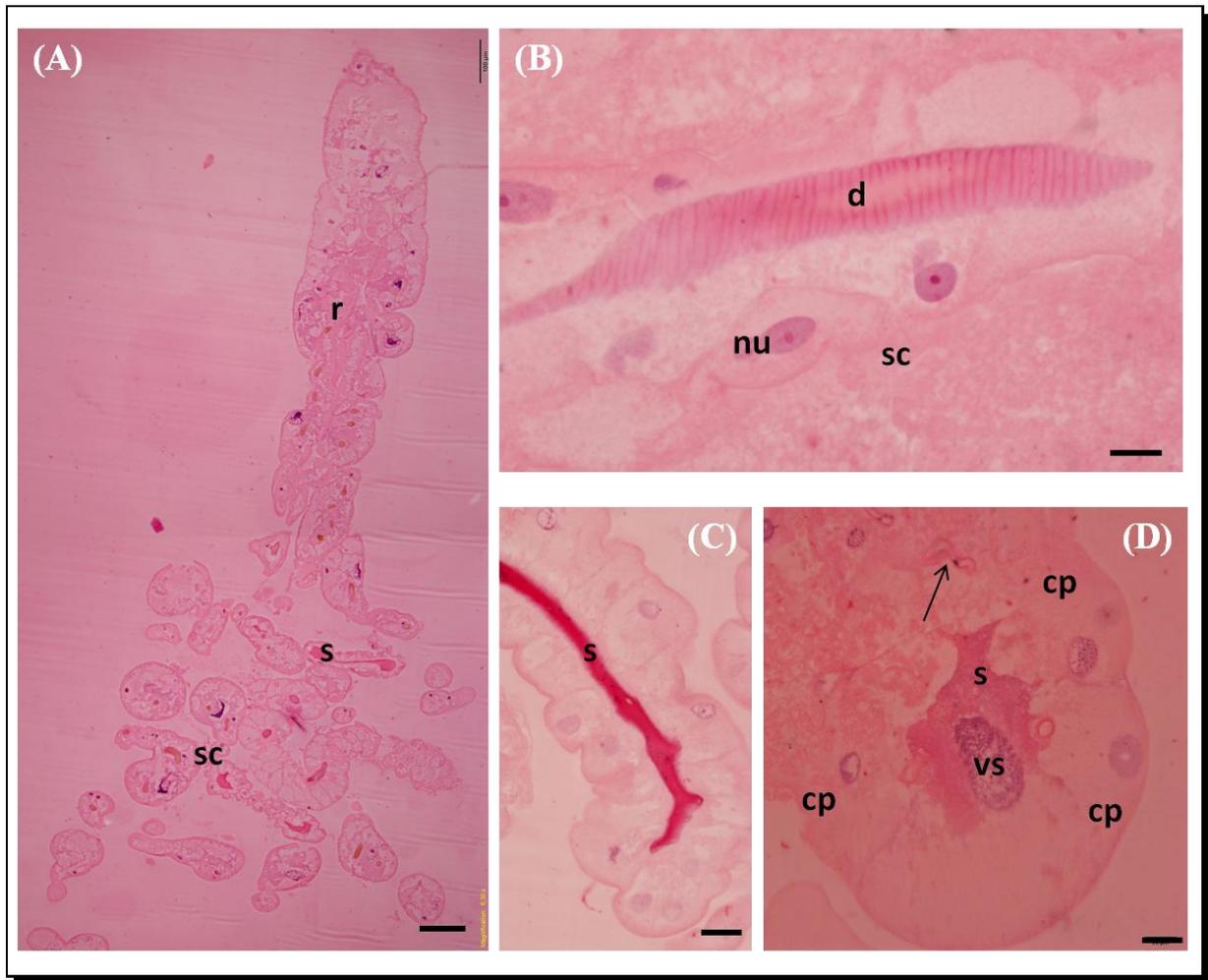


FIGURA 4.22. Vista geral da glândula labial de *Atta sexdens rubropilosa*, **(A)** células secretoras (sc), secreção (s) e reservatório (r), Barra de escala = 100 μ m. **(B)** ducto central (d) do reservatório, células secretoras (sc) e núcleo (nu) Barra de escala = 10 μ m. **(C)** Detalhe da secreção (s) Barra de escala = 20 μ m. **(D)** Detalhe da célula secretora central envolta por células parietais (cp), vesículas secretoras (vs), secreção (s) dentro da célula eos canalículos transportadores (seta) Barra de escala = 10 μ m.

A porção secretora apresenta-se formada por ácinos, onde há presença de uma célula central, circundada por células periféricas e entre estas e central há um ducto coletor da secreção, FIGURA. 4.23. Os canalículos presentes nas unidades secretoras se unem formando o ducto coletor lateral e o ducto coletor final. Esta estrutura é encontrada em algumas espécies de vespas sociais da ordem Hymenoptera como *Polistes versicolor* (ROCHA e CAETANO, 2003).

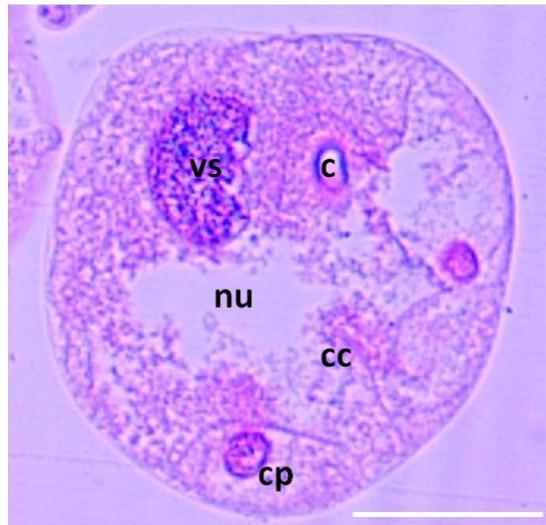


FIGURA 4.23. Detalhe do ácino operária de *Atta sexdens rubropilosa*, mostrando células central (cc), núcleo da células central (nu), canalículo (c), células parietais (cp), vesículas secretoras (vs). Barra de escala 10 μ m.

4.2.3 HISTOQUÍMICA

4.2.3.1 DETECÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

O teste de PAS/alcian mostrou que todas as espécies assim como indivíduos das diferentes castas apresentam constituintes de natureza polissacarídica, as reações foram positivas para glicoproteínas e polissacarídeos ácidos, nos diferentes sítios analisados, sendo que o epitélio secretor reagiu fracamente.

4.2.3.2 DETECÇÃO DE PROTEÍNAS

A reação fortemente positiva para o teste de bromofenol mostrou a presença de proteínas como constituinte das glândulas labiais de todas as espécies analisadas, principalmente na secreção.

4.2.3.3 DETECÇÃO DE LIPÍDIOS ÁCIDOS

Por meio desta técnica foi possível observar a presença de lipídeos ácidos nas células centrais e parietais para todas as espécies. A reação mostrou forte positividade ao teste para citoplasma das células e lúmen dos ductos.

4.2.3.4 DETECÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS

Os testes com Sudan Black B evidenciaram a presença de lipídios totais nas glândulas labiais de todas as espécies. O citoplasma das células secretoras, ductos e reservatório reagiram com forte positividade ao teste aplicado.

Para melhor visualização e entendimento os resultados dos testes histoquímicos foram resumidos nas TABELAS seguintes (4.13 à 4.19).

TABELA 4.13. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas labiais das operárias das três castas de *Atta sexdens rubropilosa*

Porções da Glândula Metapleural	Testes Histoquímicos Aplicados				
	PAS	Alcian blue	Azul de bromofenol	Azul de Nilo	Sudan black
Citoplasma das células centrais	R ++	R ++	R +++	R +++	R +++
	Gr ++	Gr ++	Gr ++	Gr ++	Gr ++
	Me ++	Me ++	Me ++	Me ++	Me ++
	Mi ++	Mi ++	Mi ++	Mi ++	Mi ++
Núcleo células centrais	R -	R +	R -	R +++	R ++
	Gr -	Gr ++	Gr -	Gr ++	Gr ++
	Me -	Me ++	Me -	Me ++	Me ++
	Mi -	Mi ++	Mi -	Mi ++	Mi ++
Citoplasma das células parietais	R +	R ++	R +++	R +++	R +++
	Gr +	Gr ++	Gr ++	Gr ++	Gr ++
	Me +	Me ++	Me ++	Me ++	Me ++
	Mi +	Mi ++	Mi ++	Mi ++	Mi ++
Núcleo das células parietais	R -	R +++	R -	R ++	R ++
	Gr -	Gr ++	Gr -	Gr ++	Gr ++
	Me -	Me ++	Me -	Me ++	Me ++
	Mi -	Mi ++	Mi -	Mi ++	Mi ++
Ductos dos ácinos	R +	R ++	R ++	R +	R +
	Gr +	Gr ++	Gr ++	Gr +	Gr +
	Me +	Me ++	Me ++	Me +	Me +
	Mi +	Mi ++	Mi ++	Mi +	Mi +
Células do epitélio de revestimento do reservatório	R +	R ++	R ++	R +	R +
	Gr +	Gr ++	Gr ++	Gr +	Gr +
	Me +	Me ++	Me ++	Me +	Me +
	Mi +	Mi ++	Mi ++	Mi +	Mi +

R= rainha; Gr = operária grande; Me = operária média; Mi = operária mínima. (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (-) negativo.

TABELA 4.14. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas labiais das operárias das três castas de *Atta bisphaerica*.

Porções da Glândula Metapleurai	Testes Histoquímicos Aplicados				
	PAS	Alcian blue	Azul de bromofenol	Azul de Nilo	Sudan black
Citoplasma das células centrais	Gr ++	Gr ++	Gr ++	Gr ++	Gr ++
	Me ++	Me ++	Me ++	Me ++	Me ++
	Mi ++	Mi ++	Mi ++	Mi ++	Mi ++
Núcleo células centrais	Gr -	Gr ++	Gr -	Gr ++	Gr ++
	Me -	Me ++	Me -	Me ++	Me ++
	Mi -	Mi ++	Mi -	Mi ++	Mi ++
Citoplasma das células parietais	Gr +	Gr ++	Gr ++	Gr ++	Gr ++
	Me +	Me ++	Me ++	Me ++	Me ++
	Mi +	Mi ++	Mi ++	Mi ++	Mi ++
Núcleo das células parietais	Gr -	Gr ++	Gr -	Gr ++	Gr ++
	Me -	Me ++	Me -	Me ++	Me ++
	Mi -	Mi ++	Mi -	Mi ++	Mi ++
Ductos dos ácinos	Gr +	Gr ++	Gr ++	Gr +	Gr +
	Me +	Me ++	Me ++	Me +	Me +
	Mi +	Mi ++	Mi ++	Mi +	Mi +
Células do epitélio de revestimento do reservatório	Gr +	Gr ++	Gr ++	Gr +	Gr +
	Me +	Me ++	Me ++	Me +	Me +
	Mi +	Mi ++	Mi ++	Mi +	Mi +

Gr = operária grande; Me = operária média; Mi = operária mínima. (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (-) negativo.

TABELA 4.15. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas labiais das operárias das três castas de *Acromyrmex rugosus*.

Porções da Glândula Metapleural	Testes Histoquímicos Aplicados				
	PAS	Alcian blue	Azul de bromofenol	Azul de Nilo	Sudan black
Citoplasma das células centrais	Gr ++	Gr ++	Gr ++	Gr ++	Gr ++
	Me +	Me ++	Me ++	Me ++	Me ++
	Mi +	Mi ++	Mi +	Mi +	Mi +
Núcleo células centrais	Gr -	Gr ++	Gr -	Gr +	Gr +
	Me -	Me ++	Me -	Me +	Me +
	Mi -	Mi ++	Mi -	Mi +	Mi +
Citoplasma das células parietais	Gr +	Gr ++	Gr ++	Gr ++	Gr ++
	Me +	Me ++	Me ++	Me ++	Me ++
	Mi +	Mi ++	Mi ++	Mi ++	Mi ++
Núcleo das células parietais	Gr -	Gr ++	Gr -	Gr ++	Gr ++
	Me -	Me ++	Me -	Me ++	Me ++
	Mi -	Mi ++	Mi -	Mi ++	Mi ++
Ductos dos ácinos	Gr +	Gr ++	Gr ++	Gr +	Gr +
	Me +	Me ++	Me ++	Me +	Me +
	Mi +	Mi ++	Mi ++	Mi +	Mi +
Células do epitélio de revestimento do reservatório	Gr +	Gr ++	Gr ++	Gr +	Gr +
	Me +	Me ++	Me ++	Me +	Me +
	Mi +	Mi ++	Mi ++	Mi +	Mi +

Gr = operária grande; Me = operária média; Mi = operária mínima. (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (-) negativo.

TABELA 4.16. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas labiais das operárias das três castas de *Acromyrmex balzanii*.

Porções da Glândula Metapleural	Testes Histoquímicos Aplicados				
	PAS	Alcian blue	Azul de bromofenol	Azul de Nilo	Sudan black
Citoplasma das células centrais	Gr ++	Gr ++	Gr ++	Gr ++	Gr ++
	Me +	Me ++	Me ++	Me ++	Me ++
	Mi +	Mi ++	Mi +	Mi +	Mi +
Núcleo células centrais	Gr -	Gr ++	Gr -	Gr +	Gr +
	Me -	Me ++	Me -	Me +	Me +
	Mi -	Mi ++	Mi -	Mi +	Mi +
Citoplasma das células parietais	Gr +	Gr ++	Gr ++	Gr ++	Gr ++
	Me +	Me ++	Me ++	Me ++	Me ++
	Mi +	Mi ++	Mi ++	Mi ++	Mi ++
Núcleo das células parietais	Gr -	Gr ++	Gr -	Gr ++	Gr ++
	Me -	Me ++	Me -	Me ++	Me ++
	Mi -	Mi ++	Mi -	Mi ++	Mi ++
Ductos dos ácinos	Gr +	Gr ++	Gr ++	Gr +	Gr +
	Me +	Me ++	Me ++	Me +	Me +
	Mi +	Mi ++	Mi ++	Mi +	Mi +
Células do epitélio de revestimento do reservatório	Gr +	Gr ++	Gr ++	Gr +	Gr +
	Me +	Me ++	Me ++	Me +	Me +
	Mi +	Mi ++	Mi ++	Mi +	Mi +

Gr = operária grande; Me = operária média; Mi = operária mínima. (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (-) negativo.

TABELA 4.17. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas labiais das operárias das três castas de *Trachymyrmex fuscus*

Porções da Glândula Metapleural	Testes Histoquímicos Aplicados				
	PAS	Alcian blue	Azul de bromofenol	Azul de Nilo	Sudan black
Citoplasma das células centrais	+	++	++	+	++
Núcleo células centrais	-	+	-	+	++
Citoplasma das células parietais	+	++	++	+	++
Núcleo das células parietais	-	+	-	+	++
Ductos dos ácinos	+	+	+	+	+
Células do epitélio de revestimento do reservatório	+	++	++	+	+

(+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (-) negativo.

TABELA 4.18. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas labiais de machos e fêmeas de *Acromyrmex rugosus*

Porções da Glândula labial	Testes Histoquímicos Aplicados				
	PAS	Alcian blue	Azul de bromofenol	Azul de Nilo	Sudan black
Citoplasma das células centrais	♂+++	♂+++	♂+++	♂++	♂++
	♀++	♀++	♀+	♀+	♀++
Núcleo células centrais	♂++	♂++	♂++	♂++	♂+
	♀+	♀+	♀+	♀++	♀+
Citoplasma das células parietais	♂++	♂++	♂+++	♂++	♂++
	♀++	♀++	♀+	♀+	♀+
Núcleo das células parietais	♂++	♂+	♂+	♂+	♂+++
	♀++	♀++	♀-	♀+	♀+
Ductos dos ácinos	♂+++	♂++	♂++	♂++	♂+
	♀+	♀++	♀+	♀+	♀+
Células do epitélio de revestimento do reservatório	♂+	♂++	♂+	♂+	♂+
	♀+	♀++	♀+	♀+	♀+

Gr = operária grande; Me = operária média; Mi = operária mínima. (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (-) negativo.

TABELA 4.19. Resultado da aplicação dos testes histoquímicos nas glândulas labiais de machos e fêmeas de *Acromyrmex balzanii*.

Porções da Glândula labial	Testes Histoquímicos Aplicados				
	PAS	Alcian blue	Azul de bromofenol	Azul de Nilo	Sudan black
Citoplasma das células centrais	♂++	♂+++	♂+++	♂++	♂++
	♀+	♀++	♀+	♀+	♀++
Núcleo células centrais	♂++	♂++	♂++	♂++	♂+
	♀+	♀+	♀+	♀++	♀+
Citoplasma das células parietais	♂++	♂++	♂++	♂++	♂++
	♀++	♀++	♀+	♀+	♀+
Núcleo das células parietais	♂++	♂+	♂+	♂+	♂++
	♀++	♀++	♀-	♀+	♀+
Ductos dos ácinos	♂++	♂++	♂++	♂++	♂+
	♀+	♀++	♀+	♀+	♀+
Células do epitélio de revestimento do reservatório	♂+	♂++	♂+	♂+	♂+
	♀+	♀++	♀+	♀+	♀+

Gr = operária grande; Me = operária média; Mi = operária mínima. (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (-) negativo.

Na FIGURA 4.24 são mostradas as lâminas de histoquímica com as cinco espécies nas diferentes técnicas.

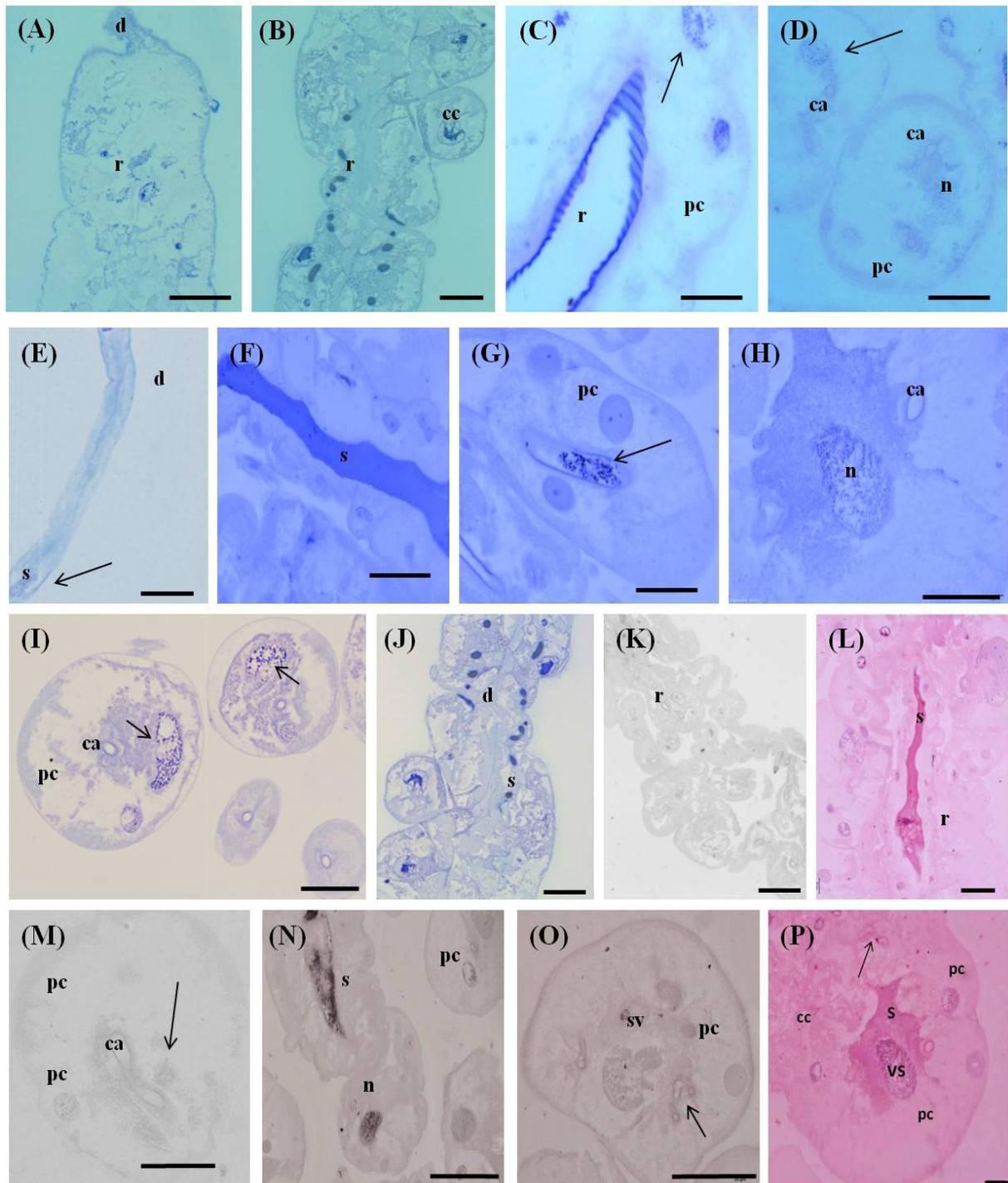


FIGURA 4.24. *Atta bisphaerica*, machos (A-B) azul de bromofenol e (K) Sudan Black para detecção de lipídeos (seta grânulos); fêmeas (C) PAS (seta grânulos de polissacarídeos); (F) Alcian blue. *Acromyrmex rugosus*: machos (D) PAS (seta grânulos de polissacarídeos); (M-N) Sudan Black para detecção de lipídeos (seta grânulos); fêmeas (E) PAS (seta grânulos de polissacarídeos); (H) alcian blue (I) Azul de nilo para detecção de lipídeos ácidos e (L) Hematoxilina/eosina. *Acromyrmex balzanii*: fêmeas (G) PAS (seta grânulos de polissacarídeos); machos (J) Azul de Nilo para detecção de lipídeos ácidos (O) Sudan Black para detecção de lipídeos seta grânulos), (P) Hematoxilina e eosina. Células secretoras (cs), núcleo (n), reservatório (r), células parietais (cp), canaliculo (ca), visculas secretoras (vs), secreção (s). Barra de escala = 10 μm.

Os resultados encontrados para os alados corroboram as análises histoquímicas das castas de operárias, a secreção é de natureza protéica e lipídica, basicamente. Resultado semelhante foi encontrado para as espécies de formiga *Cephalotes pusillus* (RIBEIRO, 2000), *Pachycondyla villosa* (ZARA, 1998) e *Scaptotrigona postica* (Petralia *et al.*, 1980). Como a literatura carece de estudos com a glândula labial de formigas cortadeiras, era fundamental estudar todas as castas.

4.2.4 ANÁLISES QUÍMICAS

A glândula labial apresentou principalmente ácidos graxos e açúcares, FIGURA 4.25. Sendo que os últimos podem ser artefatos, já que o fungo metaboliza a celulose proveniente do material vegetal cortado e levado para os jardins¹.

Os ácidos graxos são metabólitos primários, mas também constituem uma fonte de muitos metabólitos secundários. Eles existem, principalmente na natureza como triglicerídeos, onde três moléculas de ácidos graxos são esterificadas a uma molécula de glicerol (MORGAN, 2010). Estes compostos são biosintetizados pelos insetos pela ligação cabeça-cauda, a nova ligação C-C é formada através de uma condensação de Claisen, de unidades de ácido acético. Enquanto as condições reacionais no laboratório para fazer tal ligação sejam severas, há necessidade de base forte e meio totalmente anidro. Na natureza a mesma reação ocorre em sistema aquoso e pH neutro, em uma série de etapas mediadas por enzimas (TILMAN *et al.*, 1997).

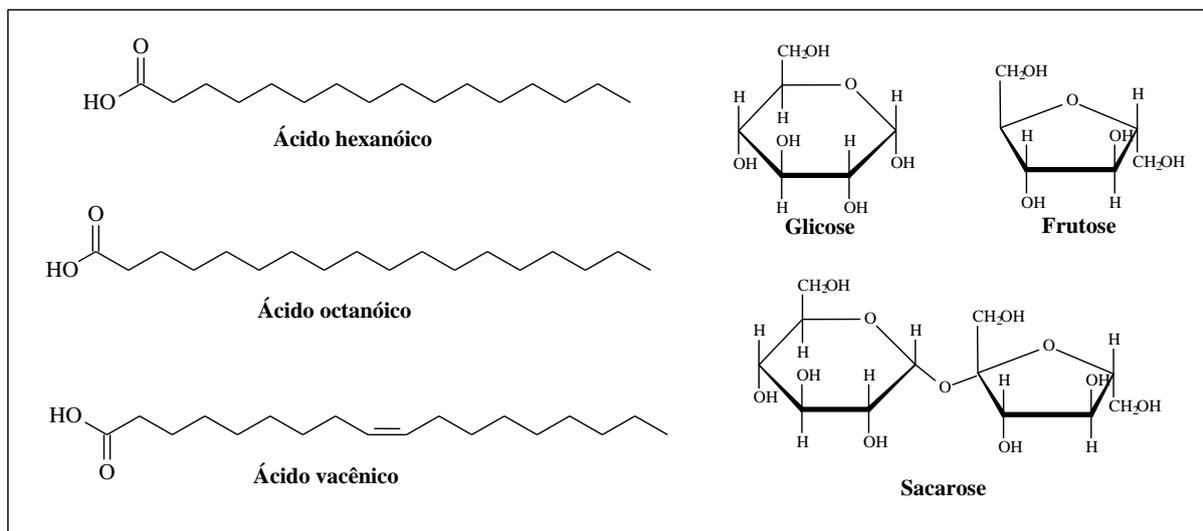


FIGURA 4.25. Compostos presentes na glândula labial das *atinis* estudadas.

4.2.5. ANÁLISE HISTO-ENZIMÁTICA

O foco do estudo com relação a glândula labial foram as enzimas. As enzimas ATP sintase ácida e básica, SDH e quitinase estão envolvidas em processos oxidativos e podem ser usadas para mensurar os níveis do metabolismo energético (CHEN *et al*, 2000). Estas já foram encontradas nas glândulas salivares de espécies na ordem Hymenoptera (VOET *et al*, 2002). Pelas técnicas utilizadas no presente trabalho, com exceção da ATP sintase básica, foi possível detectá-las em *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta bisphaerica* e *Acromyrmex balzanii*.

A quitinase mostrou-se muito ativa, é sabido que a quitinilítica tem importante função na digestão preliminar do material fúngico ingerido pelas formigas. Em trabalho publicado por Febvay (1984), foi demonstrado que para adultos de *Acromyrmex octospinosus* secretam quitinases para dentro da câmara infrabucal. Erthal *et al.* (2007) também encontrou acentuada atividade desta enzima nas glândula labiais de larvas de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. A hipótese levantada pelos autores é que além da digestão na degradação inicial do fungo, esta secreção atuaria também como forma de comunicação. Isto ocorre em *Aphis mellífera*, onde é usada na construção e sinalização dos casulos e expansão do ninho (MATHIAS DA SILVA, 2002).

Também foi observada a reação positiva para as ATPases e SDH (Fig 4.26), que forma caracterizadas por pequenos grânulos dispersos nos citoplasmas das

células e região nuclear. As células estão envolvidas na produção da secreção, e como mostrado pelas técnicas histoquímicas são ricas em proteínas, glicoproteínas. Corroborando a presença de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso que atuam na produção de ATP fornecendo energia à célula durante a síntese proteica. As ATPases também estão presentes na membrana, mostrando sua importância no transporte de íons. Esta atividade já foi mencionada para glândulas da seda de Lepidoptera (ROCHA e CAETANO, 2001). Outro relato está em *Apis mellifera*, onde a atividade de fosfatase ácida foi observada nas microvilosidades das células epiteliais do intestino, bem como na porção basal destas células, sendo esta um indicativo de intensa atividade metabólica nestas células (GREGORC *et al*, 1998), uma vez que as mesmas são responsáveis por secretarem enzimas digestivas e absorverem nutrientes (HARVEY e BLANKEMEYER, 1975).

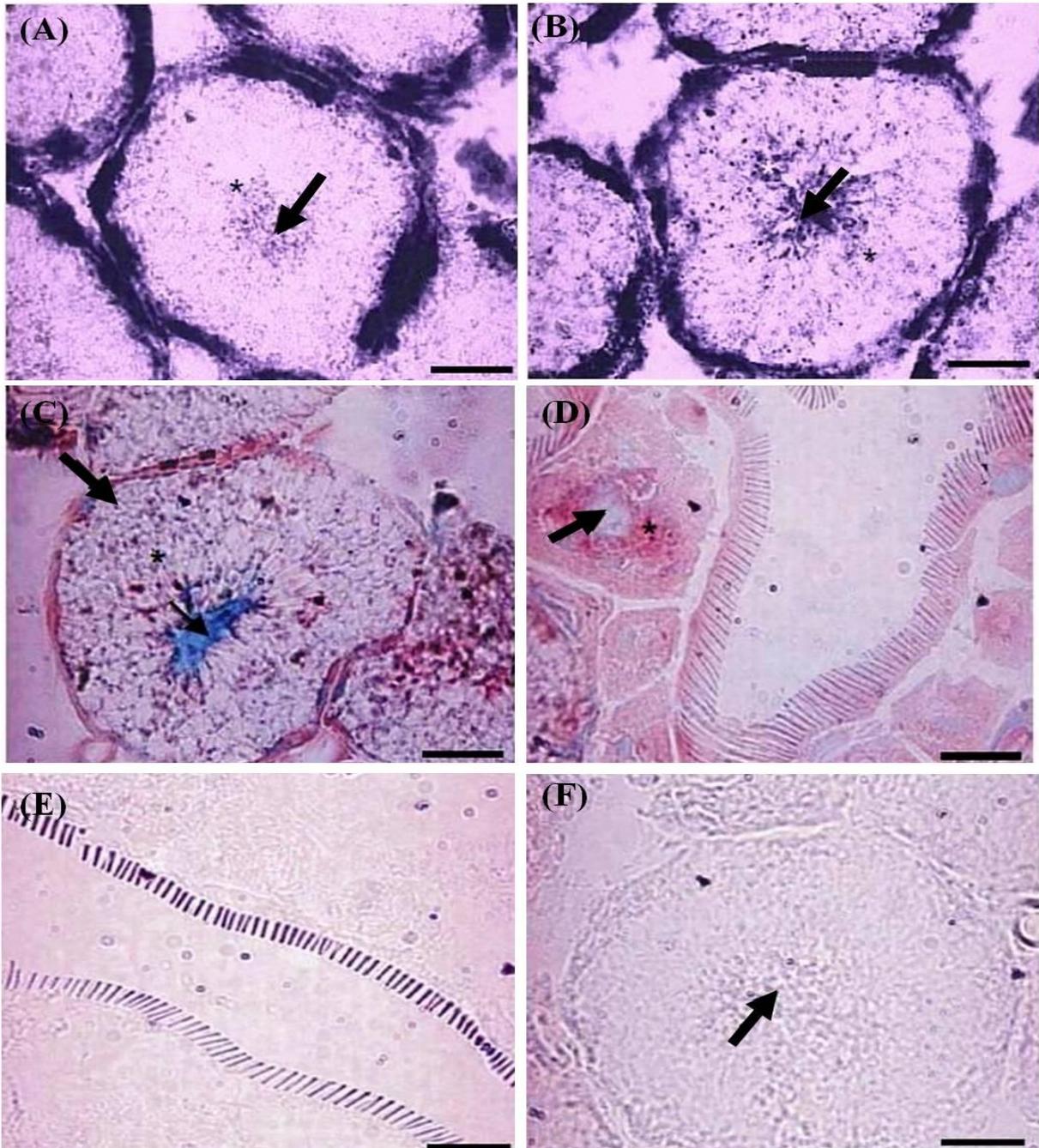


FIGURA 4.26. A e B) Reação para detecção de SDH com grânulos positivos (*) no citoplasma e concentrados na região nuclear. **C e D)** Reação para detecção de atividade de ATPsintase ácida. Notar a presença de grânulos positivos (*) no citoplasma (c). Núcleo (seta), citoplasma (c), canalículo (ca). **E e F)** Reação para detecção de atividade de ATP sintase alcalina, todos os tipos celulares apresentaram reação negativa. Barra = 20µm.

No foi observada a presença da fosfatase alcalina. Esta já foi detectada principalmente nas microvilosidades na lâmina basal do ventrículo de vespas *Myschocyttarus cerberus styx*, participando dos mecanismos de absorção e transporte de nutrientes. Segundo Gouranton (1968) e Yadav e Karyakarte (1980) a

presença de fosfatases alcalinas ao nível de concreções poderia estar, também, relacionada com mecanismos de esgotamento de reservas de glicogênio contíguas a tais estruturas. Nas células distais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, por exemplo, a atividade fosfatásica alcalina detectada em concreções laminares é sugerida como estando relacionada ao processo de calcificação dessas estruturas e/ou ao mecanismo de esgotamento de reservas de glicogênio (AZEREDO-OLIVEIRA e MELLO, 1986).

Com as análises histoquímicas foi possível caracterizar a secreção produzida pelos diferentes tecidos secretores. Ficou demonstrado que a secreção é de natureza protéica e lipídica, basicamente. Não há estudos histoquímicos na literatura da glândula labial de formigas cortadeiras, mas encontramos outros insetos da ordem Hymenoptera. Silva (1998), trabalhando com glândula labial de larvas de *Apis mellífera* mostrou que células do ducto e a secreção contida no lúmen reagiu positivamente para Azul de bromofenol e PAS, caracterizando as células secretoras e secreção como protéica, lipídica e rica em glicoconjugados. Resultado semelhante foi encontrado para as espécies de formiga *Cephalotes pusillus* (RIBEIRO, 2000), *Pachycondyla villosa* (ZARA, 1998) e *Scaptotrigona postica* (PETRALIA *et. al.*, 1980).

A glândula labial sempre foi relacionada com processos digestivos, e nesta são encontradas enzimas como amilases (GAMA e CRUZ-LANDIM, 1982). Nossos resultados além de caracterizar secreção protéica e lipídica, mostram uma abundância de células parietais nas glândulas labiais, tais células estão relacionadas à necessidade de ATP, fonte de energia para o transporte de íons (principalmente H⁺) pela membrana celular (LODISH *et. al.*, 2004). Rocha (2004) trabalhando com a vespa *Polistes versicolor*, caracterizou uma série de enzimas na glândula labial, dentre elas as ATPsintases básica e alcalina.

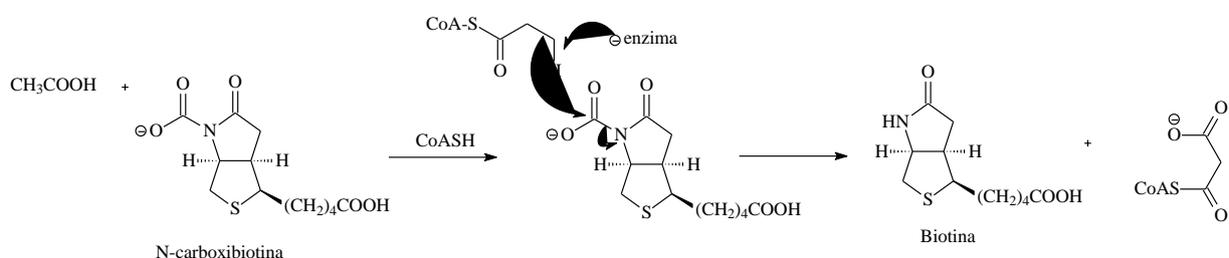
Um ponto interessante para se pensar em controle de insetos sociais é a inativação de uma enzima específica. Desta forma que atua, por exemplo, os inseticidas fosforados e sulfonas (BOARETTO e FORTI, 1997). No caso da sulfluramida, a atuação é diretamente sobre o gradiente de prótons necessário para a formação do ATP (BOARETTO e FORTI, 1997).

Uma vez que as enzimas estão ligadas a processos fundamentais da vida dos insetos, é de grande importância a identificação e isolamento das mesmas na

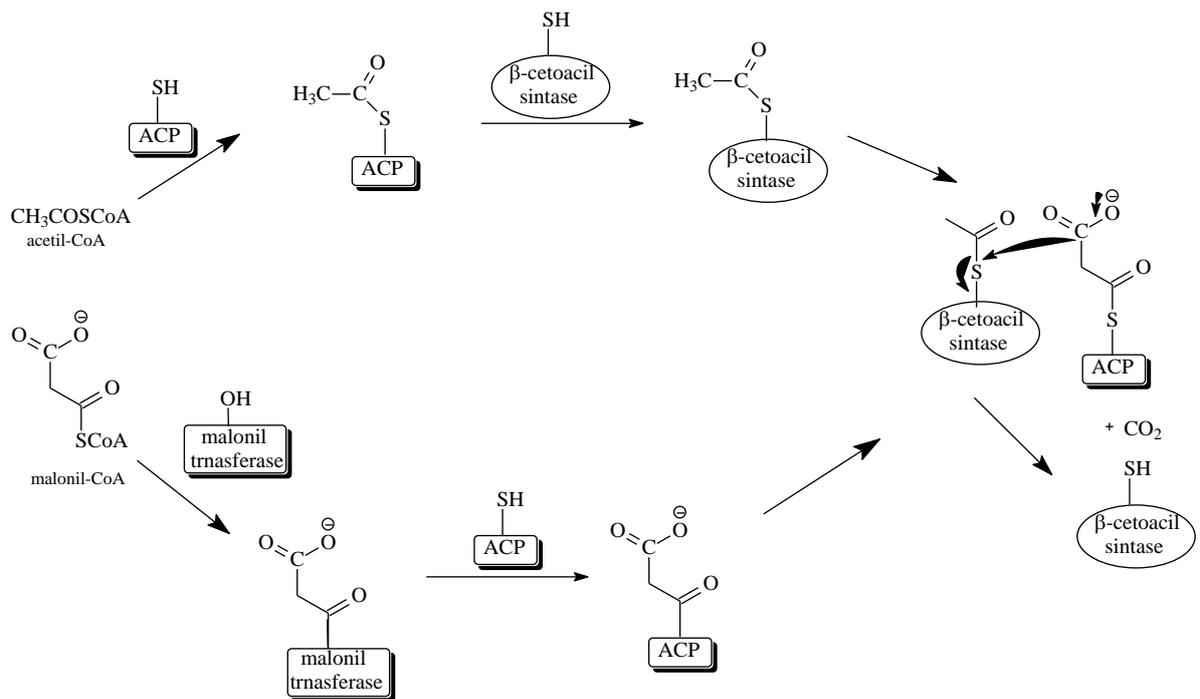
glândula labial, assim como na metapleural. O conhecimento do mecanismo de funcionamento das enzimas pode auxiliar em uma forma mais específica de controle, diferentemente dos inseticidas comerciais presentes hoje no mercado. Como exemplo, a glândula metapleural que secreta uma série de ácidos que auxiliam na manutenção das condições assépticas da colônia. A inibição de uma enzima determinante na síntese destes compostos torna a colônia mais propensa ao ataque de microorganismos patogênicos presentes no próprio solo, onde constroem seus ninhos.

Os resultados mostram alto grau de similaridade na morfologia e histoquímica das glândulas labiais e metapleurais entre as espécies estudadas e indivíduos presentes nas diferentes castas. Os produtos sintetizados pelas células secretoras são constituídos de elementos lipídicos, protéicos, polissacarídeos ácidos e glicoproteínas. Contudo, as análises químicas das glândulas metapleurais não mostram ser constantes, há evidentes diferenças quali e quantitativas dos metabolitos secretados entre as espécies.

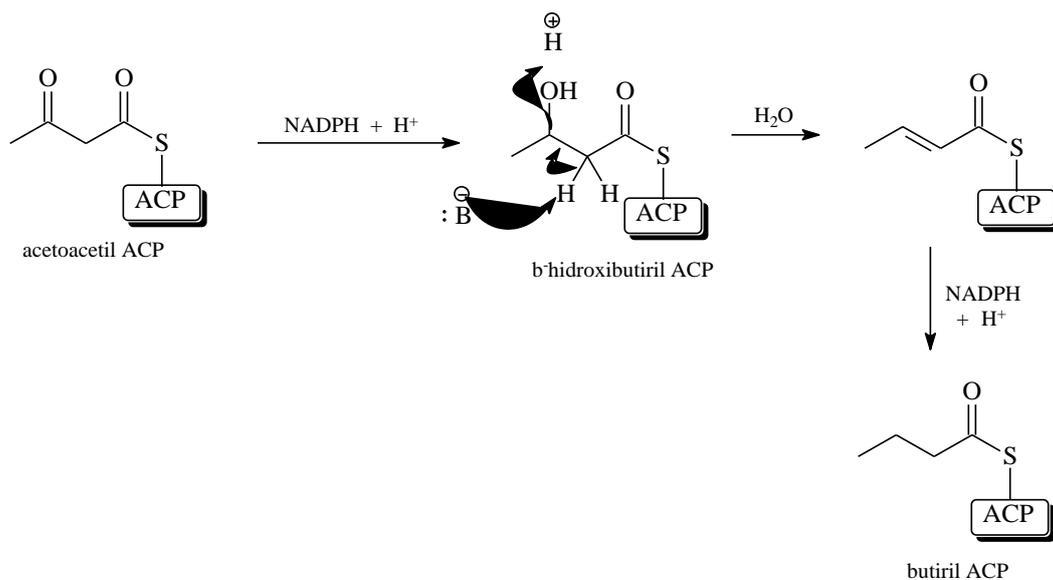
Uma outra enzima isolada do extrato glandular de *Atta sexdens rubropilosa* foi a enzima ácido graxo sintase (*FAS = fatty acid synthase*) na glândula metapleural. Esta enzima é constituída por um sistema enzimático de dois peptídeos. As FAS têm como principal função catalisar a síntese de palmitato a partir de acetil-CoA e malonil-CoA na presença de NADH, gerando cadeia de ácidos graxos (MORGAN, 2010). A biosíntese do grupo malonil a partir de um acetato usa a N-carboxibiotina para levar o CO. A partir da biotina o grupo carboxil é transferido à acetil-CoA, convertendo-a em malonil-CoA, que apresenta maior reatividade.



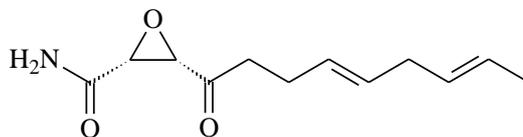
Para o crescimento da cadeia um grupo acetil é transferido pela coA para a proteína transportadora de acilo (ACP), e desta para a α -cetoacil-ACP.



Em seguida, ocorre a condensação entre etil e o malonato, seguida pela redução do grupo ceto, desidratação do álcool e a redução da ligação dupla. O grupo butirilo formado passa para a α -cetoacil-ACP e é substituído por outra molécula de malonato ACP. O ciclo continua ocorrendo novamente a condensação.



Um composto que atua na inibição das FAS é o antibiótico cerulenina [(2S)(3R)-2,3-epoxi-4-oxo-7,10-dodecadienoil amida], que foi isolada pela primeira vez do fungo *Cephalosporium caerulens* (MATSUMAE *et al.*, 1968).



A inibição ocorre porque a molécula se liga à β -cetoacil-ACP, bloqueando a interação desta com a malonil-CoA (STRAUB *et al.*, 2002). Também foi relatado que este composto estimula a oxidação dos ácidos graxos a partir da ativação da CPT-1, outra enzima que também é inibida pela malonil-CoA. O mecanismo envolve a tioacilação covalente que inativa esta enzimas permanentemente (TOBIN e WHEATLEY, 2004).

A partir dos resultados biológicos e do que foi exposto sobre a FAS, propõe-se a continuação do trabalho que está sendo desenvolvido, tendo como foco complementar a síntese de análogos da cerulenina. Estes análogos serão incorporados na dieta das formigas e ensaiados em mini-colônias.

Os ninhos de formigas cortadeiras são formados no solo, que é um ambiente rico em microorganismos patogênicos. Além disso, o fungo simbiote constitui uma fonte rica de nutrientes para estes microorganismos, que não se manifestam nas colônias pelo eficiente mecanismo de defesa desenvolvido pelas formigas cortadeiras. Através da ruptura desta defesa química natural, a colônia se tornará vulnerável ao ataque dos agentes potencialmente prejudiciais, constituindo assim uma forma eficiente de controle destes inseto-pragas.

4.3. SÍNTESE DE ANÁLOGOS DA CERULENINA

Dado a grande importância biológica da cerulenina, foram extensivamente investigados na literatura científica sua síntese (NORIOSHI et al., 1979) bem como de alguns de seus análogos estruturais (LAURENCE et al., 1999). Neste sentido, como extensão a este projeto de pesquisas, visualizou-se a possibilidade de propor a síntese de alguns análogos da cerulenina objetivando uma extensão aos testes de atividade biológica já descrito. Os alvos propostos foram desenhados tendo como base alguns resultados da literatura, onde alguns deles já apresentam sua síntese descrita, sendo outros inéditos. Assim, além dos análogos estruturais diretos da cerulenina, FIGURA 4.27, outras estruturas são propostas tendo como base as seguintes observações:

- Um ponto importante foi que o grupo epóxido não foi essencial, onde amidas α,β -insaturadas apresentaram significativa atividade antimicrobiana (ESCHENLIPPOLD et al., 2009). Com isso, sugere-se a investigação desta característica através da síntese das lactonas insaturadas, em sistemas acíclicos, assim como dos epóxidos, FIGURA 4.27(a) e (b).

- *Análogos contendo grupos metileno em substituição ao grupo γ -carbonílico apresentaram seletividade antimicrobiana* (JAKUBOWSKI et al., 1982). Serão averiguadas a influência de grupos hidroxilas em substituição ao grupo γ -carbonílico, assim como a ausência de um substituinte oxigenado, FIGURA 4.27(c).

- Verifica-se a manutenção da atividade antimicrobiana de alguns análogos que apresentaram cadeia alquílica saturada. Desta forma, planejou-se a introdução de cadeias alquílicas saturadas “R”, de tamanhos variados, assim como a introdução de grupos aromáticos, conforme delineado na FIGURA 4.27(d).

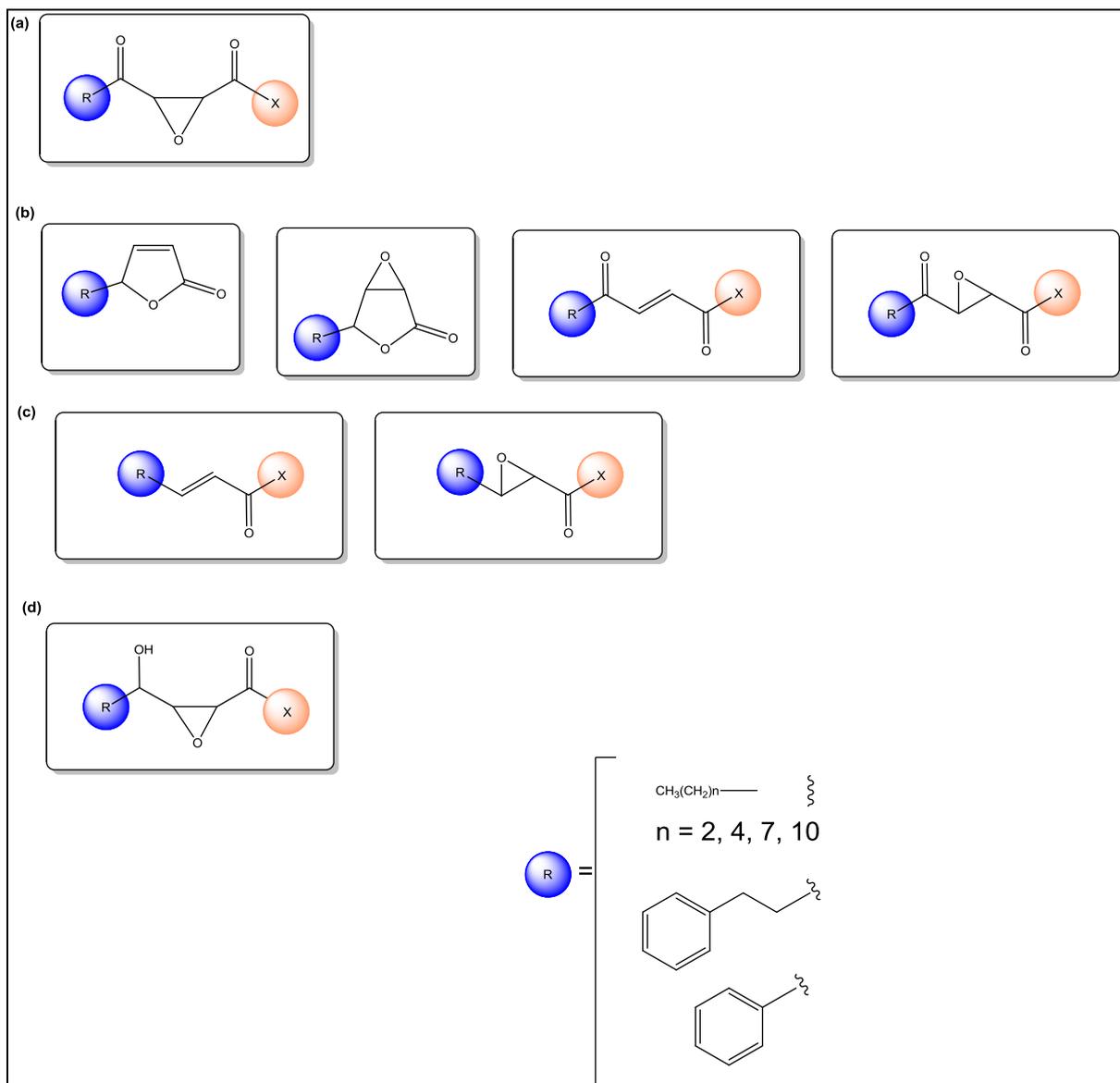


FIGURA 4.27. Esquema geral da síntese dos derivados da cerulenina.

Inicialmente será discutida a síntese dos aldeídos e, em seguida, discutir-se-á a aplicação destes em reações de adição conjugada. Posteriormente, será abordada a funcionalização dos adutos.

Os aldeídos **4**, **5** e **6** empregados neste estudo podem ser obtidos comercialmente, contudo a rota sintética desenvolvida foi iniciada via reações de oxidação com alcoóis, FIGURA 4.28. A estrutura foi comprovada por cromatografia gasosa aliada à espectrometria de massas. Em geral é possível observar o íon molecular de aldeídos alifáticos, mesmo que fraco algumas vezes. É muito comum

observar o íon $m/z = 44$ proveniente do rearranjo de McLaffert. Na FIGURA 4.29 é mostrado o espectro de massas do octanal.

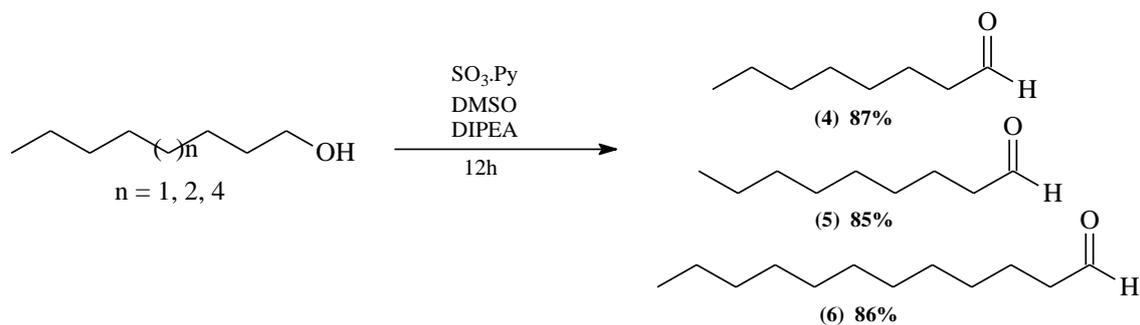


FIGURA 4.28. Síntese dos aldeídos alifáticos, octanal **(4)**, decanal **(5)** e dodecanal **(6)**

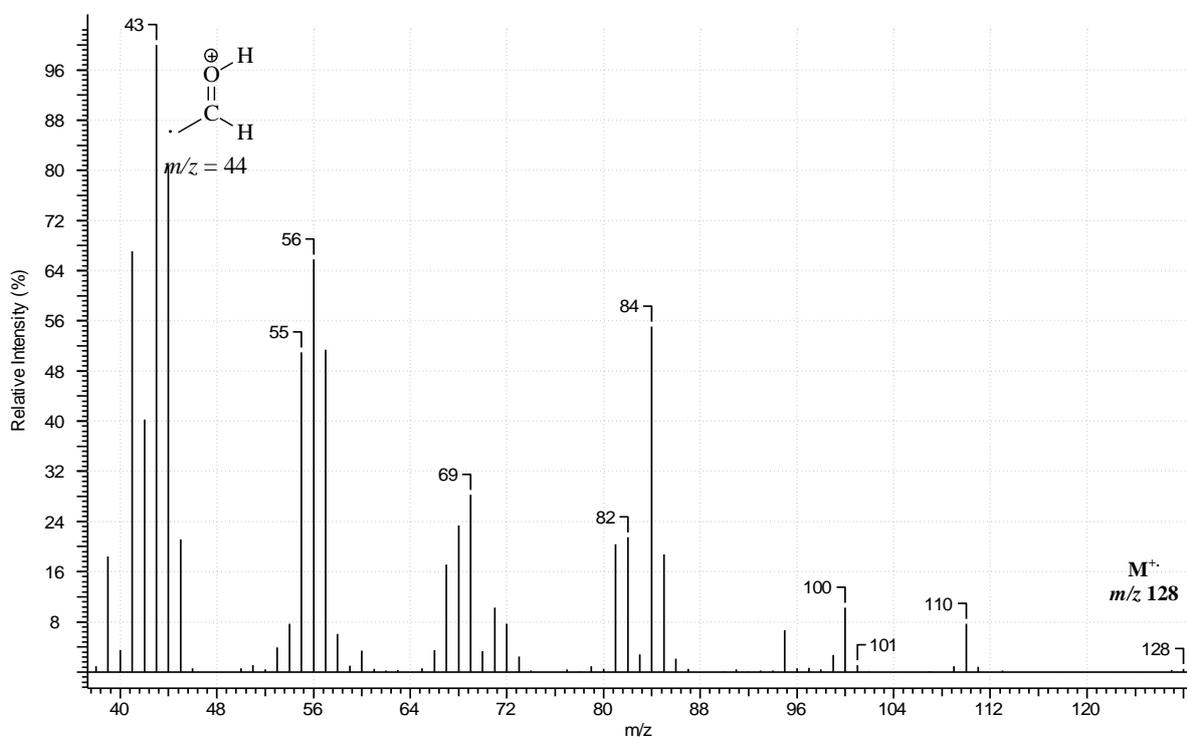


FIGURA 4.29. Espectro de massas do octanal **(4)**.

Os espectros de massa e fragmentação característica do decanal **(5)** e dodecanal **(6)**, encontram-se no Apêndices (F-G)

A reação de Horner-Wadsworth-Emmons entre os aldeídos **4-6** e o dietilfosfonato, FIGURA 4.30, forneceu as olefinas **7-9**. Na FIGURA 4.31 é mostrado

o perfil de fragmentação dos ésteres etílicos, representados pelo espectro de massas do 2-octenoato de etila.

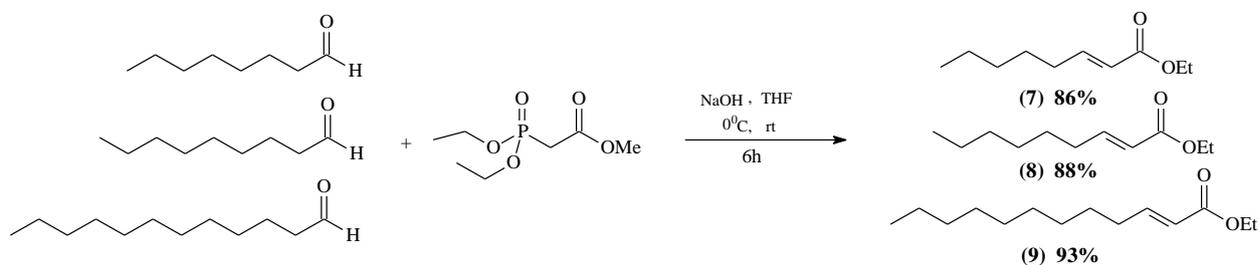


FIGURA 4.30. Síntese dos ésteres α,β insaturados, 2-octenoato de etila (7), 2-decenoato de etila (8) e 2-dodecenoato de etila (9).

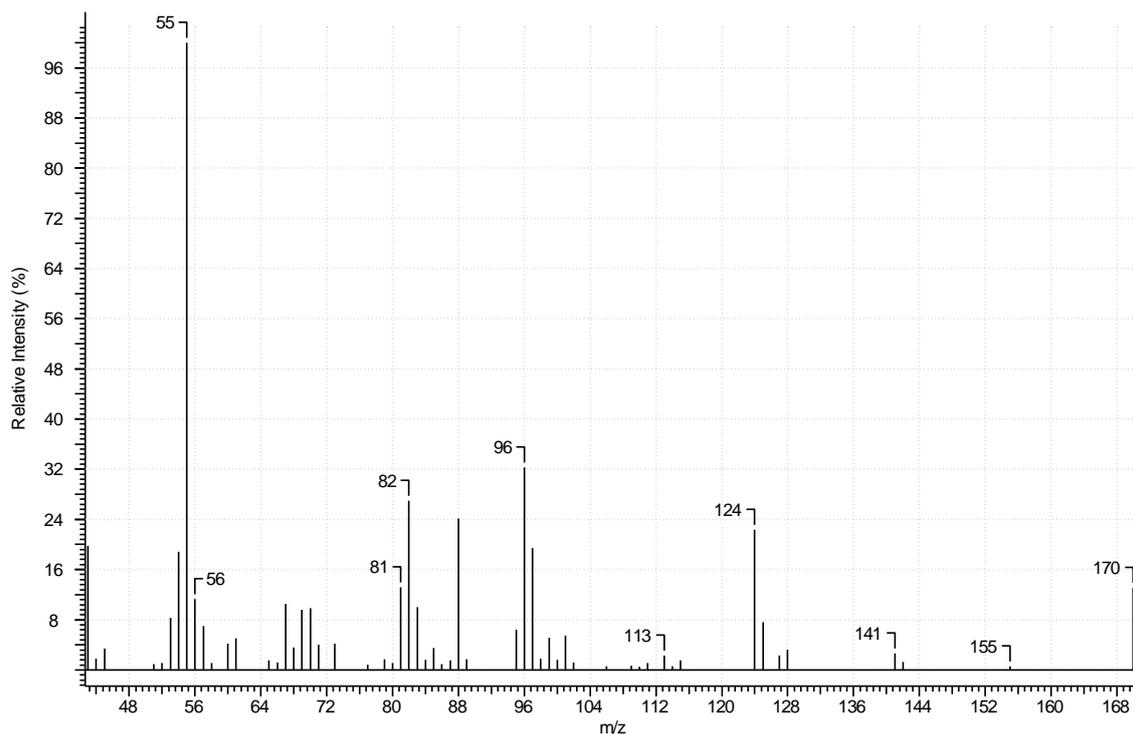


FIGURA 4.31. Espectro de massas do 2-octenoato de etila (7).

Os espectros de massa e fragmentação característica dos produtos 2-decenoato de etila (**8**) e 2-dodecenoato de etila (**9**) encontram-se no Apêndices (H-I)

Posteriormente os ésteres foram submetidos a reações de epoxidação com ácido m-cloroperbenzóico (MCPBA) fornecendo os análogos **10-12**, FIGURA 4.32.

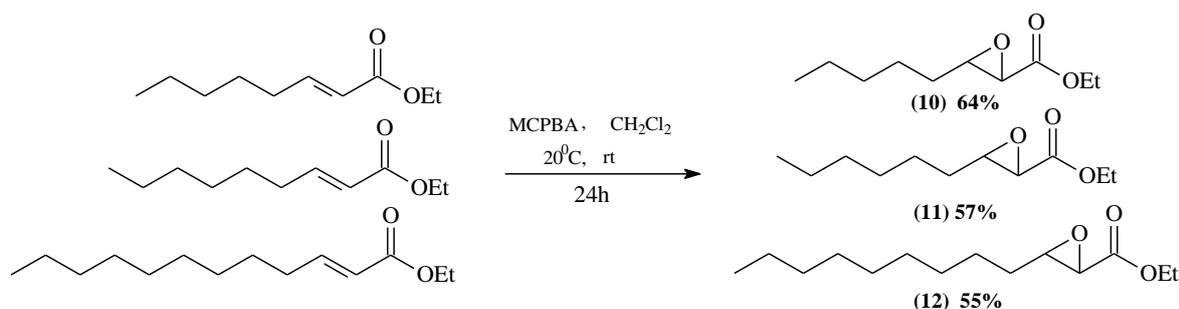


FIGURA 4.32. Epoxidação dos ésteres α,β insaturados, 2-epoxi-octanoato de etila (**10**), 2-epoxi-decanoato de etila (**11**) e 2-epoxi-dodecanoato de etila (**12**).

A título de exemplo será discutido a atribuição dos sinais nos espectros de Ressonância Magnética Nuclear para o composto **10** como o representante dessa classe, FIGURA 4.33. Os espectros de massas, RMN ¹H e RMN ¹³C, encontram-se nos apêndices (J – O).

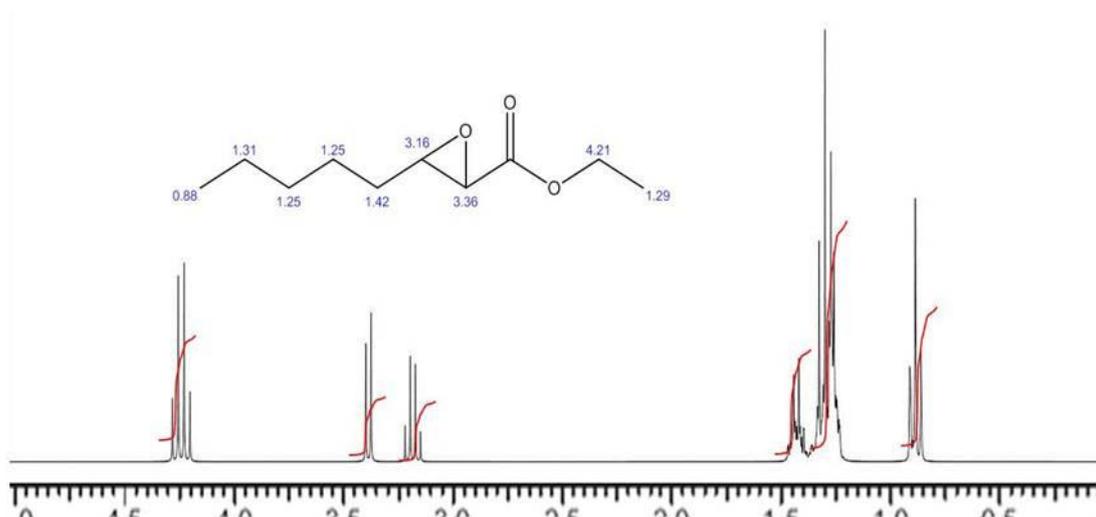


FIGURA 4.33. Espectro de Espectro de RMN ^1H do 2-epoxi-octanoato de etila (**10**) em CDCl_3 a 400 MHz.

As metilas estão localizadas região compreendida entre δ_{H} 0,88 e 1,29, sendo observados 2 tripletos ($J = 8.0$ Hz) que com integração referente a 3 hidrogênios cada. Na região entre δ_{H} 1,31 e 1,42, encontra-se um multipletto ($J = 7.1$ Hz) com integração referente aos hidrogênios dos grupos $-\text{CH}_2$ da porção alquílica da molécula. Em δ_{H} 4,21 observa-se um quarteto com integração referente aos 2 hidrogênios mais blindados vizinhos ao heteroátomo. E por último, encontram-se os sinais característicos do epóxido, um dupletto ($J = 7.1$ Hz) em δ_{H} 3,36 e um quadrupletto ($J = 7.1$ Hz) em δ_{H} 3,16.

Os demais espectros para esta classe de compostos, MS, RMN ^1H e RMN ^{13}C , encontram-se nos apêndices (P - S).

A FIGURA 4.34 mostra a preparação dos análogos dicarbonílicos. O melhor resultado obtido foi com o aldeído **5**. O mecanismo começa com o ataque nucleofílico do acetileno de lítio obtido a partir do composto propargílico, seguido da adição do aldeído **5** correspondente, fornecendo o éster hidroxi- α,β -alquinóico, 4-hidroxi-hex-2-inoato de etila (**13**), 4-hidroxi-oct-2-inoato de etila (**14**), 4-hidroxi-hexadec-2-inoato de etila (**15**), e 4-hidroxi-5-fenilpent-2-inoato de etila (**16**). Em seguida foi realizada a reação de hidrogenação de Lindlar, a qual, além de promover a hidrogenação *cis* da dupla ligação, leva a reação de lactonização *in situ* e obtendo-se as lactonas 5-etil-furan-2(5H)-ona (**17**), 5-butil-furan-2(5H)-ona (**18**), 5-dodecil-furan-2(5H)-ona (**19**), 5-benzil-furan-2(5H)-ona (**20**). Em seguida, foi realizada uma reação de epoxidação nucleofílica promovida por hipoclorito de sódio, fornecendo as epóxi-cetonas: 4-etil-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**21**), 4-butil-

3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**22**), 4-dodeca-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**23**), 4-benzil-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**24**).

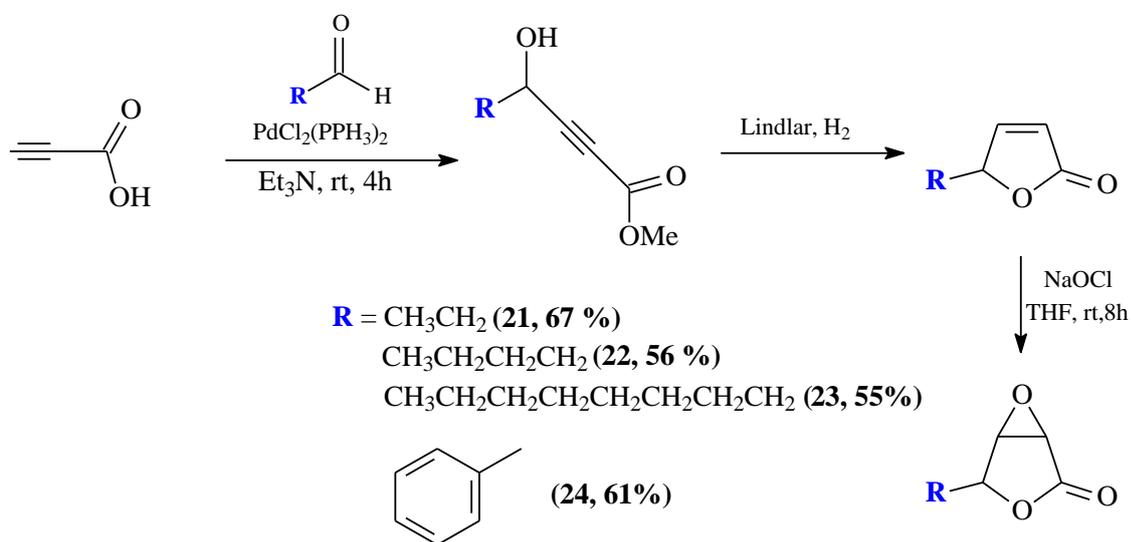


FIGURA 4.34. Preparação das epóxi-cetonas, 4-etil-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**21**), 4-butil-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**22**), 4-dodeca-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**23**), 4-benzil-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**24**).

A título de exemplo será discutido a atribuição dos sinais nos espectros de Ressonância Magnética Nuclear para os compostos **20** e **23** como o representante dessas classes, FIGURA 4.35. Os demais espectros para esta classe, MS, RMN ^1H e RMN ^{13}C , encontram-se nos apêndices (T - V).

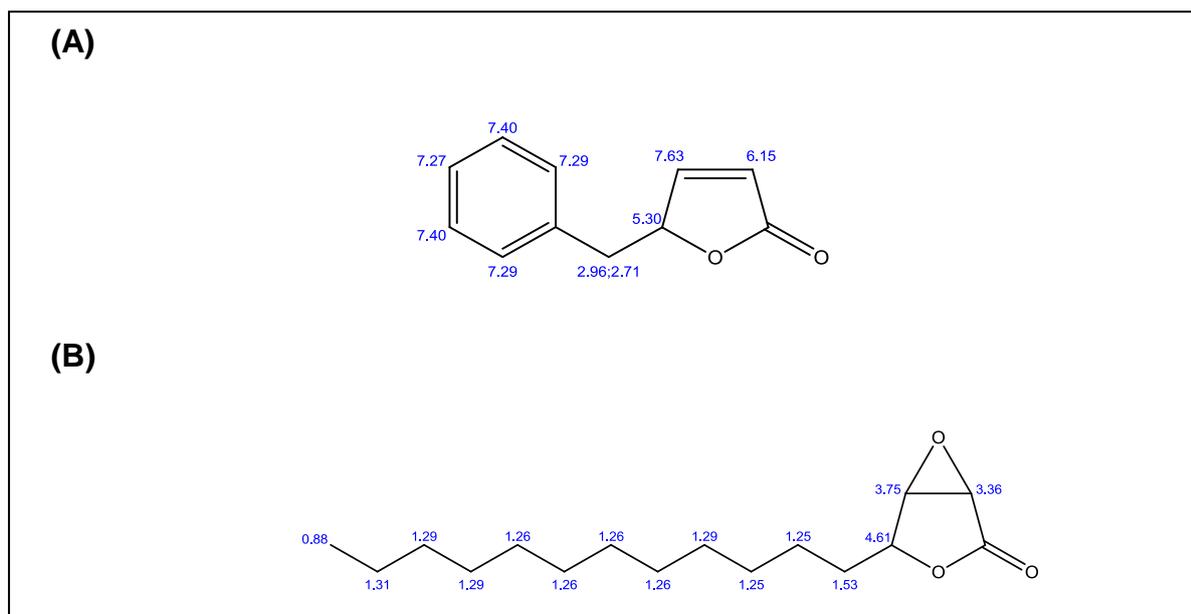


FIGURA 4.35- Espectros de RMN ^1H (A) 5-benzil-furan2(5H)-ona (**20**) e (B) 4-dodeca-3,6-dioxabicyclo-[3.1.0]-hexan-2-ona (**23**) em CDCl_3 a 400 MHz.

Na FIGURA 4.35 (A) observa-se na região de δ_{H} 7,27 a 7,40 os sinais característicos do anel benzeno da substância **20**. Na região compreendida entre δ_{H} 2,71 e 2,96 encontram-se multipletos com integrações referentes aos dois hidrogênios do grupo CH_2 . Os hidrogênios da ligação insaturada da lactona encontram-se como um duplete em δ_{H} 6,15 e um triplete em δ_{H} 7,83. A FIGURA 4.45 (B) apresenta o espectro de RMN ^1H do composto **23**. O multipletos entre δ_{H} 1,25 e 1,29 é característico dos grupos $-\text{CH}_2$ da cadeia alquílica, apresentando integração para 20 hidrogênios. Na região de δ_{H} 3,38 a 4,61 encontra-se um duplete ($J = 7.0$ Hz) em 3,36 ppm, um triplete ($J = 7.0$ Hz), em δ_{H} 3,75 e um quadrupletos ($J = 7.00$ Hz) em δ_{H} 4,61.

A abertura das lactonas ocorreu pela utilização da espécie nucleofílica NH_3 fornecendo os álcoois 3-(1-hidroxipropil)-oxirano-carboxiamida (**25**), 3-(1-hidroxipentil)-oxirano-carboxiamida (**26**), 3-(1-hidroxitridecil)-oxirano-carboxiamida (**27**), 3-(1-hidro-2-pheniletil)-oxirano-carboxiamida (**28**), FIGURA 4.36. Por fim, foi realizada uma reação de oxidação nas condições de Perick-Doring, onde o DMSO atua como oxidante, ativado pelo complexo $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ na presença de uma base. Desta forma, foram fornecidos os derivados dicarbonílicos 3-propionil-oxirano-2-

carboxiamida **(29)**, 3-pentanoil-oxirano-2-carboxiamida **(30)**, 3-tridecanoil-oxirano-2-carboxiamida **(31)**, 3-pentilacetil-ioxirano-2-carboxiamida **(32)**.

Os demais espectros para esta classe, MS, RMN ^1H e RMN ^{13}C , encontram-se nos apêndices (X - Z).

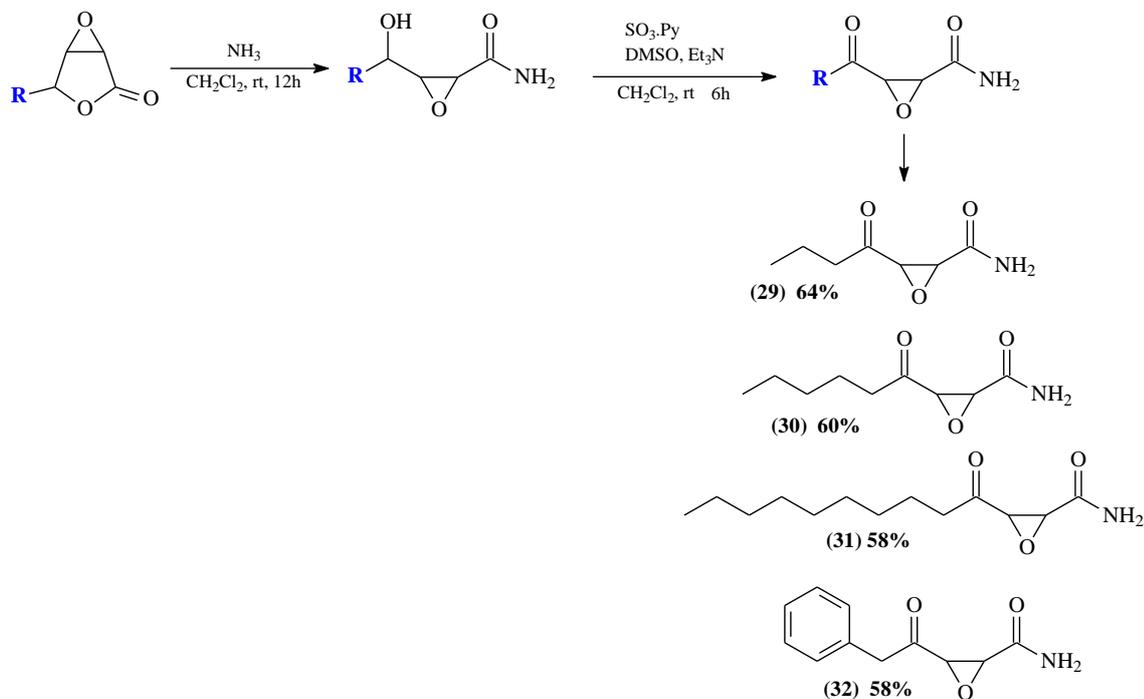


FIGURA 4.36. Preparação dos análogos di-carbônicos, 3-propionil-oxirano-2-carboxiamida **(29)**, 3-pentanoil-oxirano-2-carboxiamida **(30)**, 3-tridecanoil-oxirano-2-carboxiamida **(31)**, 3-pentilacetil-ioxirano-2-carboxiamida **(32)**

A título de exemplo será discutido a atribuição dos sinais nos espectros de Ressonância Magnética Nuclear para o composto 3-tridecanoil-oxirano-2-carboxiamida **(31)**, como o representante dessa classe, FIGURA 4.37.

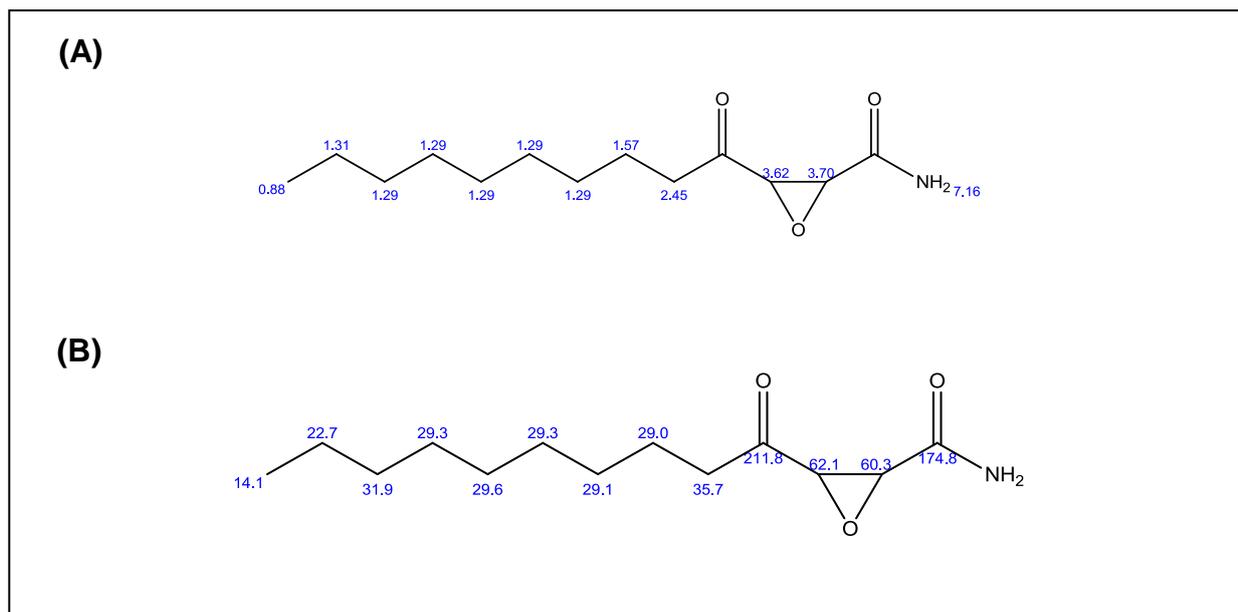


FIGURA 4.37- Espectro de RMN ^1H e ^{13}C do 3-tridecanoil-oxirano-2-carboxiamida (**31**) em CDCl_3 a 400 MHz.

Além dos sinais já discutidos, para o composto **31** são sinais característicos, dois dubletos dos hidrogênios do epóxido em δ_H 3,62 e 3,60 e um singleto largo em δ_H 7,16 típico dos hidrogênios do grupo amina. No espectro de RMN ^{13}C os sinais característicos são os carbonos quaternários em δ_C 211,8 e 174,8, que é mais blindado por ser vizinho a um elemento mais eletronegativo. E os carbonos do epóxido em δ_C 62,1 e 60,3 ppm.

Um problema na rota sintética tem sido o acoplamento do hidrocarboneto insaturado na cadeia lateral ($R = CH_3-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2CH_2-$). Todas as estratégias experimentais abordadas falharam.

4.4. BIOENSAIOS

4.4.1. ENSAIOS NAS FORMIGAS CORTADEIRAS

As FIGURAS 4.38 a 4.40 mostram os resultados dos ensaios realizados com os compostos sintéticos **30**, **31** e **32**. Nos gráficos (o eixo X representa os dias e o eixo y representa a % de sobrevivência). Na análise dos resultados dos ensaios de toxicidades para operárias devem ser considerados basicamente três variantes, a primeira delas é a mortalidade a partir do terceiro dia, pois é o período em que a isca (contendo a substância) possa ser carregada e espalhada para o formigueiro todo; a segunda variante é o dia em que foram mortas 50% das operárias, o chamado S_{50} , quanto menor esse dia (maior que 3) melhor é o inseticida, pois se deve analisar que passados 3 dias, a isca se espalhou para o formigueiro todo e após esse dia conseguiu matar 50% da população de formigas; e a última variável é a quantidade de formigas mortas no final do experimento.

Pela análise das FIGURAS observam-se os melhores resultados para os compostos **30** e **32** que apresentaram atividade inseticida, tendo um S_{50} antes do décimo dia. O mesmo efeito não foi observado para os compostos **31**. Mostrando o efeito da relação estrutura x atividade, cadeia alquílica maior e mais rica em elétrons foi mais ativo. Ao fim do experimento, a porcentagem de mortalidade para **30**, **31** e **32** foram respectivamente: 84, 52 e 88%.

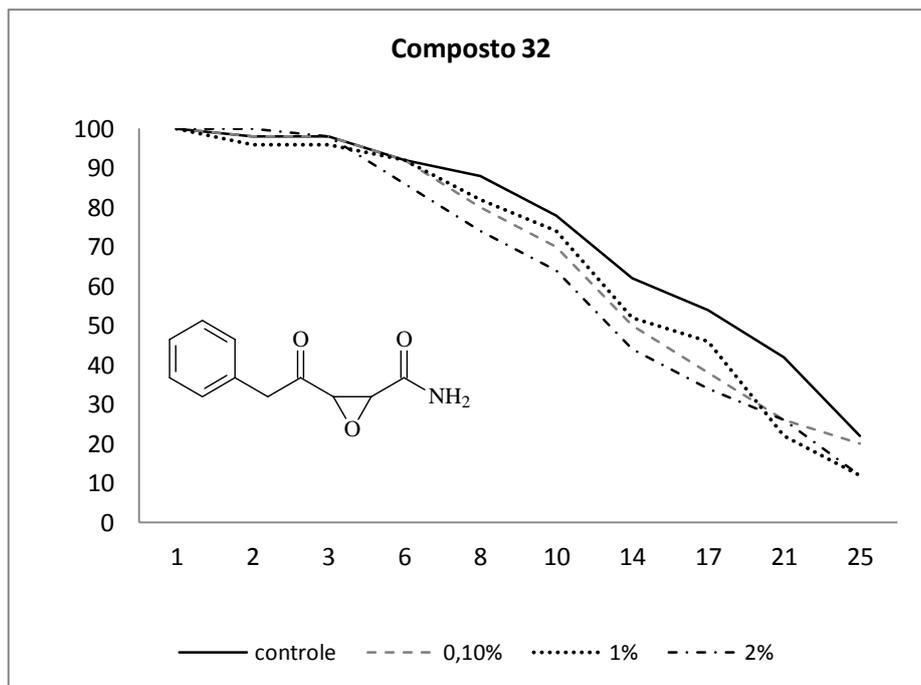


FIGURA 4.40 – Curvas de sobrevivências de operárias submetidas a ensaios de ingestão com o composto **32** em 3 concentrações (0,1; 1,0 e 2,0%).

Ao se analisar a porcentagem de mortalidade ao final do experimento, observa-se que os compostos dicarbonílicos foram os que apresentaram melhores resultados, se comparado ao controle. Contudo, o fato dos compostos não apresentarem alta toxicidade não é um ponto negativo. Como é esperada uma ação sobre a colônia, um composto menos agressivo não é detectado facilmente pelas formigas, desta forma se espalha sobre as diversas câmaras dentro da colônia.

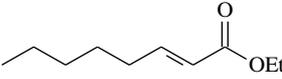
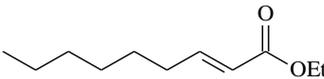
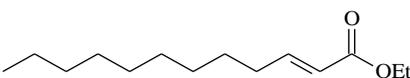
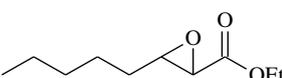
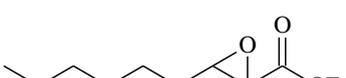
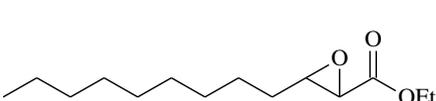
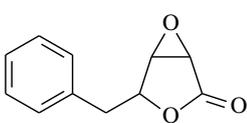
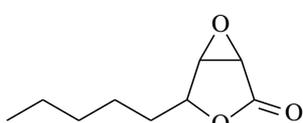
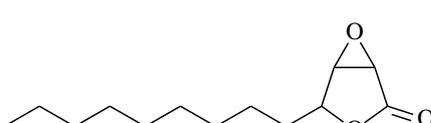
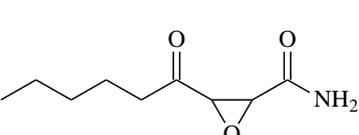
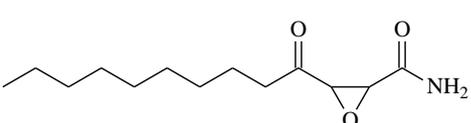
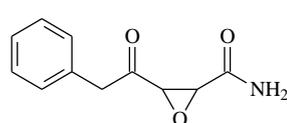
4.4.2 ENSAIO ENZIMÁTICOS

Os análogos sintéticos da serulenina e alguns intermediários foram utilizados em ensaios de inibição de acetilcolinesterase e ácido-graxosintase.

Ao se observar a TABELA 4.20 e as FIGURA 4.41 e 4.42 verifica-se que alguns derivados apresentaram baixa inibição da enzima AChEee, ACHEhu e AGS ficando a porcentagem entre > 0,5-34,8 %. Contudo os análogos **30**, **31** e **32** apresentaram inibição da enzima em até 89,9% .

Estes resultados mostram ser muito promissores, pois a inibição da síntese destes ácidos graxos que conferem proteção à colônia, é uma forma eficiente de controle. Pois assim, a colônia fica vulnerável ao ataque dos inimigos naturais que habitam os ninhos

TABELA 4.20. Resultados dos ensaios de inibição com as enzimas AChE realizados e AGS

Substância	Falso - positivo	(%) inibição AChE _{ee} 200 μM	(%) inibição AChE _{hu} 200 μM	(%) inibição AGS 200 μM
	-	9,8	3,2	0,5
	-	11,0	15,3	4,6
	-	9,4	4,3	17,3
	-	35,2	66,9	22,1
	-	61	39,8	26,4
	-	51,0	45,1	27,2
	-	17,0	0,9	9,1
	-	7,0	16,1	9,0
	-	12,2	1,2	34,5
	-	66,1	54,8	65,7
	-	79,9	60,4	86,8
	-	80,7	55,1	89,1
Cerulenina		90,7	65,1	95,9

4.4.3 ENSAIOS FUNGICIDAS COM *Leucoagaricus gongylophorus*

Os análogos **30**, **31** e **32** foram ensaiados frente ao fungo simbiote. A FIGURA 4.41 mostra os resultados de inibição. Não foi possível observar uma inibição expressiva para os compostos. O melhor resultado foi para **32** que apresentou 44 % de atividade inibitória. Este é o análogo com maior semelhança estrutural do composto alvo, cerulenina. Os compostos **30** e **31** apresentaram inibição moderada de 18 e 22%.

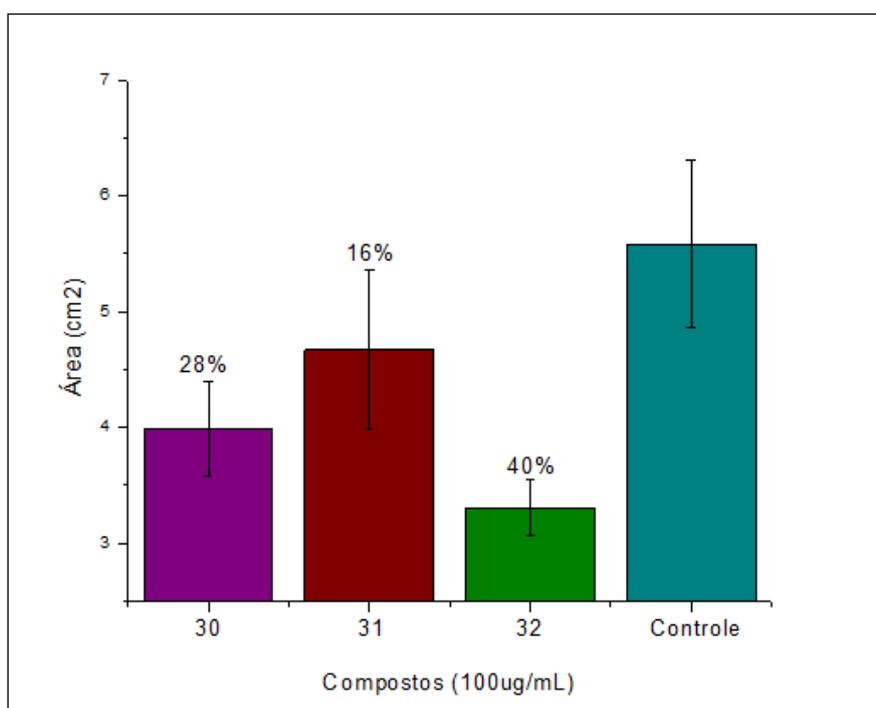


FIGURA 4.41. Ensaio de inibição sobre o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

A baixa toxicidade sobre o jardim de fungo também é outro aspecto positivo, já que dificulta a identificação das formigas do princípio ativo como sendo maléfica à colônia.

5-CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Apesar dos avanços de pesquisas aplicadas a formigas cortadeiras, ainda há muito para ser explorado no que diz respeito às condições assépticas das colônias. Esta área é carente de estudos detalhados e constitui um fator primordial para o conhecimento de características biológicas, comportamental e evolutiva das formigas cortadeira. Cabe ressaltar que para alcançar sucesso com um tipo de controle eficaz e menos agressivo ao meio ambiente, ter o conhecimento destes aspectos é fundamental.

Os resultados das análises morfológicas, histoquímicas e histoenzimáticas estabelecem que em operárias de diferentes castas das cinco espécies analisadas a glândula metapleurale e labial apresentam grande semelhanças. Os compostos sintetizados pelas células secretoras são constituídos de elementos lipídicos, protéicos, polissacarídeos ácidos e glicoproteínas.

O alto grau de similaridade na morfologia das glândulas metapleurale e labial entre espécies sugere a importância evolutivas das mesmas. Se compararmos estas glândulas com a glândula de veneno, por exemplo, a última teve sua função e morfologia (ferrão atrofiado) modificada com a evolução. A função primária que era a produção de veneno foi convertida na síntese de feromônio de trilha. Assim, as colônias alcançaram maior eficiência no forrageamento contribuindo para a fundação de colônias mais numerosas. É importante ressaltar que não podemos descartar outras funções diferentes da manutenção asséptica da colônia, para as glândulas labial e metapleurale.

Na segunda etapa do trabalho, foram sintetizados 32 compostos, sendo três deles análogos estruturais da cerulenina, o inibidor enzimático. Dentre eles, o 3-pentanoil-oxirano-2-carboxiamida **(30)**, 3-tridecanoil-oxirano-2-carboxiamida **(31)**, 3-pentilacetil-ioxirano-2-carboxiamida apresentaram melhores resultados nos ensaios de inibição enzimática e frente à mortalidade dos adultos de *Atta sexdens rubropilosa*, com exceção do composto **31**.

A busca por inibidores enzimáticos é uma forma de extrema importância entre os novos meios de controle de insetos, por atuar de forma específica. Assim esta linha de pesquisa é promissora. Especialmente para espécies de *Atta sexdens rubropilosa* que causam maior prejuízo econômico e os resultados indicam que potencias inibidores foram sintetizados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACÁCIO-BIGI, M.F.M; TORKOMIAN, V.L.V.; DE GROOTE, S.T.C.; HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. e DA SILVA, M.F.G.F. Activity of the *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine to the leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, (Hymenoptera, Formicidae) and to the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *Pest. Manag. Science*, 60, 933-938, 2004.

ADAMS, R. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publ Corp., Carol Stream, IL, USA, 469p. 1995

ALBERTS, B., JOHNSON, A., WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed,. 1549p. 2004.

ALVES, S.B.; SOUZA GOMES, D. Virulência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). *Poliagro*, 5, 1, 1-9, 1983.

AMBROZIN, A.R.P.; LEITE, A.C.; BUENO, F.C.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; BUENO, O.C.; DA SILVA, M.F.G.F.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A.; BACCI JR., M. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. *J. Braz. Chem. Soc.*, 17, 542-547, 2006.

ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S.; ZOGHBI, M.G.B., Volatile constituents of the leaves, fruits and flowers of cashew (*Anacardium occidentale*), *J. Food Comp. Anal.*, 13, 227-232, 2000.

ANGUSM, C.J.; JONES, K.; BEATTIE, A.J. A possible explanation for size differences in the metapleural glands of ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Austr. Entomol. Soc.* 32,13-11, 1993.

BAGNÈRES, A. & MORGAN, E. The postpharyngeal glands and the cuticle of Formicidae contain the same characteristic hydrocarbons. *Experientia*, 47, 106-111, 1991.

BEATTIE, A.J., TURNBULL, C., HOUGH, T., KNOX, R.B. Antibiotic production: A possible function for the metapleural glands of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79, 448-450, 1986.

BOARETTO, M.A.C. E FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. Série técnica IPEF, São Paulo, 11, 30, 31-46, 1997.

BOT, A.N.M.; ORTIUS-LECHNER, D.; FINSTER, K., MAILE, R; BOOMSMA, J.J. Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insect Soc.* 49, 363-370, 2002.

BOT, A.N.M., BOOMSMA, J. J. Variable metapleural gland size-allometries in *Acromyrmex* leafcutter ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Kansas Entomol. Soc.* 69, 375-383, 1996.

BOT, A.N.M., OBERMAYER, M.L., HÖLLDOBLER, B., BOOMSMA, J.J. Functional morphology of the metapleural gland in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Insect Soc.* 48, 63–66, 2001.

BUENO, O.C.; MORINI, M.S.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A.; SILVA, O.A. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 26: 107-113, 1997. Falta título

BUTLER, 1954 APUD MOTA & CRUZ-LANDIN. Cell reorganization and cell death during the secretory cycle of the hypopharyngeal gland in Meliponinae bee workers (Hymenoptera: Apidae). *Acta Microsc.*, 6. Supl. B. Proc. XVI Meeting of the Brazilian Society for Eletron Mycroscopy, 75-78, 1967

CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F.J. Formigas: biologia e anatomia. Rio Claro: Gráfica e Editora Topázio. 42p. 2002.

CARDOSO, C.L.; LIMA, V.V.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; Andricopulo, A.D.; Wainer, I.W.; Moaddel, R.; Cass, Q.B.. *J. Chrom. A*, 1120, 151-, 2006. Falta título e página final

CARR, J. B.; DURHAM, H. G. *U.S. Patent* 4.091.221, 1978

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. Yeasts associated with nests of the leaf cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* forel, 1908. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71, 243–248, 1997

CASTELLANI, A. *J.Tropical Med.Hyg.* 42: 225-226, 1939. Falta título

CHEN, G.; McWILLIAMS, M.L.; FECHTER, L.D. Succinate dehydrogenase (SDH) activity in hair cells: a correlate for permanent threshold elevations. *Hear. Res., Amsterdam*, 145, 91-100, 2000.

CHERRETT, J.M. The biology, pest status and control of leafcutting ants. *Agric. Zool.* 1, 1-37, 1986.

COLLINS, C.H. Princípios básicos de cromatografia. In: Introdução a métodos cromatográficos. 7 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 11-27,.1997.

CRUZ-LANDIM, C. Cell reorganization and cell death during the secretory cycle of the hypopharyngeal gland in Meliponinae bee workers (Hymenoptera: Apidae). *Acta Microsc.*, 6. Supl. B. Proc. XVI Meeting of the Brazilian Society for Eletron Mycroscopy, 75-78, 1967.

CRUZ-LANDIM, C.; SAENZ, M.H.P. Estudo Comparativo de algumas Glândulas dos Vespoidea (Hymenoptera). *Papéis avulsos. Zool. São Paulo*, São Paulo, 25,251-263, 1972.

CURRIE, C.R.; SCOTT, J.A; SUMMERBELL, R.C; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, 398, 701–704, 1999a.

CURRIE C.R.; MUELLER U.G; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc. Royal Soc.* 96, 7998–8002, 1999b.

CURRIE, C.R.; STUART, A.E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proc. Royal Soc.* 268, 1033–1039, 2001.

DE SOUZA, A.L.B., SOARES, I.M.F., CYRINO, L.T., SERRÃO, J.E. The Metapleural Gland in Two Subspecies of *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 47, 19-25, 2006.

DELLA LÚCIA, T.M.C; ANJOS, N.; SILVA, A.M.; BARCELOS, J.A.V.; BENTO, J.M.S.; FOWLWER, H.G.; FORTI, L.C.; FREITAS, G.D.; MORAES, E.J.; MOREIRA, D.D.O.; OLIVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, M.A.; PINHÃO, M.A. S.; VILELA, E.F. YASSU, W.K. *As formigas cortadeiras*. Viçosa: Folha de Viçosa, 212-241, 1993.

DO NASCIMENTO, R.R.D., SCHOETERS, E., MORGAN, E.D., BILLEN, J., STRADLING, D.J. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes*, and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). *J. Chem. Ecol.* 22, 987-1000, 1996.

ECOBICHON, D.J. Toxic effects of pesticides. In Cassarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons Ed. McGraw-Hill, New York. 810p..2001,

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, D.; ANDRES V.; FEATHERSTONE, R.M.. *Bio. Pharmac.*, 7: 88-90, 1961. Faltou o título

ERTHAL JUNIOR, M.; SILVA, C.P.; SAMUELS, R. I. Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. *J. Insect Phys.* 50, 881-891, 2004.

ESCHEN-LIPPOLD, L.; DRAEGER, T.; TEICHERT, A.; WESSJOHANN, L.; WESTERMANN, B.; ROSAHL, S.; ARNOLD, N. *J. Agric. Food. Chem.*, 57, 9607, 2009. Faltou título

FARJI-BRENNER, A.G.F.; RUGGIERO, A. Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhabiting Argentina: patters in species richness and geographical range sizes. *J. Biogeog.* 21: 391-399, 1994

FEBVAY, G.; DECHARME, M.; KERMARREC, A. Digestion of chitin by the labial glands of *Acromyrmex octospinosus* Reich (Hymenoptera: Formicidae). *Canadian J. Zool.* 62, 229–234, 1984.

FERNANDEZ-MARIN, H., ZIMMERMAN, J., REHNER, S., WCISLO, W. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proc. Royal Soc. London Biolog. Scie.* 273, 1689-1695, 2006.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J.K.; WCISLO, W.T. Ecological traits and evolutionary sequence of nest establishment in fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). *Biol. J. Linnean Soc.*, 81, 39-48, 2004.

FERREIRA, J.T.B.; CORRÊA, A.G.; VIEIRA, P.C (Org). Produtos Naturais no Controle de Insetos. 2 ed. São Carlos: EdUFSCar, p.9-19, 2001,

FOWLER, H.; PEREIRA-DA-SILVA, V.; FORTI, L.C.; SAES, N. Population dynamics of leaf-cutting ants: a brief review. *In: Logfren, C. S. & Vander Meer, R. K. (Ed.), Fire Ants and Leaf-Cutting Ants: Biology and Management*, p. 123–145. Boulder, Colorado: Westview Press. 1986.

FURUKAWA, J.; FUNABASHI, H.; MORISAKI, N.; IWASAKI, S.; OKUDA, S. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 1229-....1988

GAMA, V. & CRUZ-LANDIM, C. Estudo comparativo das glândulas dos sistema salivar de formigas (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, São Paulo, 7, 145-165, 1982.

GOURANTON, J. Observations histochimiques et hisoenzymologiques sur le tube digestif de quelques homopteres cercopides et jassides. *J. Insect Physiol., Oxford*, 14, 569-579, 1986

GREGORC, A.; BOWEN, I.D. Programmed cell death in the honey-bee (*Apis mellifera* L.) larvae midgut. *Cell Biol. Intern.* [S.I], 21, 151-158, 1997.

GREGUS, Z.K. AND KLAASEN C.D.. The Basic Science of Poisons. Ed. McGraw-Hill, New York. 810 p, 2001.

GUSMÃO, L.G. Estudo comparado da glândula metapleural e sua secreção em diferentes castas de três espécies de *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). 60p. Tese (Doutorado) - ESALQ-USP, Piracicaba-SP, 2000.

GUSMÃO, L.G., CAETANO, F.H., NAKANO, O. Ultramorphology of the metapleural gland in three species of *Atta* (Hymenoptera, Formicidae). *Iheringia, Série Zoologia*, 91, 33-36, 2007.

HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Candicidin producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *Proc. Nat. Acad. Scie.* 106, 4742-4746, 2009.

HAMM, S.; BLETON, J.; CONNAN, J.; TCHAPLA, A., A chemical investigation by headspace SPME and GC-MS of volatile and semi-volatile terpenes in various olibanum samples, *Phytochemistry*, 66, 1499-1514, 2005.

HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART D.L.; MCDOWALL, R.D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17:193-218, 1988.

HAERVEY, W.R.; BLANKEMEYER, J.T. Epithelial structure and function, In: Maramorosch, K., Shope, R.E. eds. *Invertebrate Immunity*, 1o Edição, New York: Academic Press, 3-22, 1975.

HEBLING, M.J.A.; MAROTI, O.S.; BUENO, O.C.; SILVA, A.O.; PAGNNOCCA, F.C. *Bull. Entomol. Res.*86, 253-..., 1996. Fata título e pg final

HERNÁNDEZ, J.V.; JAFFÉ, K. Dano econômico causado por populações de formigas *Atta laevigata* (F.Smith) em plantações de *Pinus caribaea* Mor e elementos para o manejo da praga. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 24, 287-298, 1995.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. *The superorganism*. Cambridge: W. W. Norton & Company, 2008.

HUGHES, W.O.H. & BOOMSMA, J.J. Genetic diversity and disease resistance in leaf-cutting ant societies. *Evolution* 58, 1251–1260, 2004.

JAKUBOWSKI, A.A.; GUZIEC JR., F.S.; SUGIURA, M.; TAM, C.C.; TISHLER, M. *J. Org. Chem.*, 47, 1221-..., 1982. Falta título e pg final

JAFFE, K.; VASQUEZ, C.; BRANDWIJK, L.; CABRERA, A. Metapleural gland secretions in ants. In: Lenoir, A., Arnold, G., Lepage, M. (Eds.). *Les Insectes Soc.*. Paris: Université Paris Nord, 217, 1994.

JONES, G.R.; OLDHAM, N.J. Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. *J. Chromat. A*, 843, 199–236, 1999.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. *Histologia básica* - 11ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.U., JUNQUEIRA, L.M.M.S. Técnicas básicas de citologia e histologia. Livraria Editora Santos, pp. 48-81, 1983.

KEDAR, T.E.; MILLER, M.W.; HEGEDUS, L.S. *J. Org. Chem.* 61, 6121-..., 1996. Faltou título e pg final

LAERENGE, D. S.; ZILFOU, J. T.; SMITH, C. D. *J. Med. Chem.*, 42, 4932-..., 1999. Faltou título e pg final

LANDOLT, P.J.; AKRE, R.D. Ultrastructure of the thoracic gland of the queens of the western yellowjacket *Vespula pensylvanica* (Hymenoptera: Vespidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 72, 586-590, 1979.

LISON, L., *Histochimie et Cytochimie Animales*, Gauthier-Villars, Éditeur, Paris. 1960.

LITTLE, A.E.F.; CURRIE, C.R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant–microbe symbiosis. *Biol. Lett.* 3, 501–504, 2007.

LITTLE, A.E.F.; MURAKAMI, T.; MUELLER, U.G.; CURRIE, C.R. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biol. Lett.* 2, 12–16, 2006.

LITTLE, A.E.F.; MURAKAMI, T.; MUELLER, U.G.; CURRIE, C.R. The infrabuccal pellet piles of fungus-growing ants. *Naturwissenschaften*, 90, 558–562, 2003.

LÓPEZ, O. and FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.G. Green trends in insect control, RSC Publishing, 375 p, 2011.

LODISH, H.; BERK, A.; Kaiser, C.A.; Krieger, M. Molecular Cell Biology, 5th Edition - Lodish, Harvey, 967pp., 2007.

MANI, N. S.; Townsend, C. A. *J. Org. Chem.* 96, 5000-...1997. Faltou título e pg final

MARINHO, J. BALWANI, S.; KULSHRESHTHA, A.; NANDI, D.; JAISANKAR, P.; GHOSH, B. “Ethyl gallate isolated from *Pistacia integerrima* Linn. inhibits cell adhesion molecules by blocking AP-1 transcription factor”. *J. Ethnopharm.* 137, 1345 – 1352, 2006.

MATHIAS DA SILVA, F.H. “Molecular and phylogenetics of Meliaceae (Sapindales) based on nuclear and plastid DNA sequences”. *Am. J. Bot.*, 90, 471-480, 2003.

MASCHWITZ, U.; KOOB, K.; SCHILDKNECHT, H. Ein Beitrag zur Funktion der Metathorakaldr use der Ameisen. *J. Insect Phys.* 16, 387–404, 1970.

MATSUMAE, H., YAJIMA H, KOMATSU M, AIZAWA T, Sharp GWG. The effects of cerulenin, an inhibitor of protein acylation; 51, S91–S95, 1968. Falta o nome da revista

MAYHÉ-NUNES, A.J. Sinopse do gênero *Mycetarotes* Emery (Hym., Formicidae), com a descrição de duas espécies novas. *Bol. Entomol. Venez.* 10, 197-205, 1995.

MCCLOSKEY JA, Mass spectrometry of fatty acid derivatives. In: Topics in lipid chemistry. Logos Press, London, 1970.

MEER, V.; BREED, M.; WINSTON, M.; ESPELIE, K. E. Pheromone communication in social insects. Boulder, Westview Press, p. 1-8, 1998.

MENDONÇA, A.L.; DA SILVA, C.E.; DE MESQUITA, F.L.; CAMPOS, R.S.; DO NASCIMENTO, R.R.; XIMENES, E.C.; SANT'ANA, A.E. Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95, 295-303, 2009.

MIDDELHOVEN, W.J.; FONSECA, A.; CARREIRO, S.C.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C. *Cryptococcus haglerorum*, sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83, 167–174, 2003

MORGAN, E.D.; KEEGANS, S.J.; TITS, J.; WENSELEERS, T.; BILLEN, J. Preferences and differences in the trail pheromone of the leaf-cutting ant *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). *Eur. J. Entomol.* 103, 553–558, 2006.

MORGAN E. Biosynthesis in Insects, Advanced Edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010

MORGAN, E.D. Trail pheromones of ants. *Physiol. Entom.* 34, 1-17, 2009

MUELLER, U.G.; GERARDO, N.M.; AANEN, D.K.; SIX, D.L.; SCHULTZ, T.R. The evolution of agriculture in insects. *Ann. Rev. Ecol. Evol. System*, 36, 563–95, 2005.

MUELLER, U.G.; DASH, D.; RABELING, C.; RODRIGUES, A. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. *Intern. J. Org. Evol.* 62, 2894–2912, 2008.

NASCIMENTO, R.R., MORGAN, E.D., MOREIRA, D.D.O., DELLA LUCIA, T.M.C. Trail pheromone of leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Forel). *J. Chem. Ecol.* 20, 1719-1724, 1994.

NASCIMENTO, R.R., SCHOETERS, E., MORGAN, E.D., BILLEN, J., STRADLING, D.J. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes*, and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae), *J. Chem. Ecol.* 22, 987-1000, 1996.

NORDLUND, D.A.; LEWIS, W.J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *J. Chem. Ecol.* 2, 211-220, 1976

NORIOSHI, S.; HIROSHI, O.; HIROYOSHI, K. *Tetrahedron Lett.*, 22, 2039-.....,1979. Faltou título do artigo e pg final

NOIROT, C., QUENNEDEY, A., Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. *Ann. Soc. Entomol. France* 27, 123-128, 1991..

NORTH, R.D., JACKSON, C.W.; HOWSE, P.E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leafcutting ants. *Trends Ecol. Evol.* 12, 386–389,1997.

ORTIUS-LECHNER, D., MAILE, R., MORGAN, E.D., BOOMSMA, J.J. Metapleural gland secretion of the leaf-cutter ant *Acromyrmex octospinosus*: New compounds and their functional significance. *J. Chem.Ecol.* 26, 1667-1683, 2000.

PAGNOCCA, F.C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N.S.; BACCI JR, M; Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leafcutting ants. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94, 517-526, 2008.

PEARSE, A.G.E. Histochemistry. Theoretical and Applied, 4th ed. J & A Churchill, London, 1985.

PETRALIA, R.S.; SORENSEN, A.A.; VINSON, S.B. The labial gland system of larvae of the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. *Cell Tissue Res.* 206, 145-156, 1980.

PIETRASZKIEWICZ, M.; Sinaÿ, P. *Tetrahedron Lett.* 22, 4741-....1979. Faltou título e pg. final

POULSEN, M., BOT, A.N.M., NIELSEN, M.G., BOOMSMA, J.J. Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Behav. Ecol. Sociob.* 52, 151-157, 2002.

RENARD, M.; GHOSEZ, L.A. *Tetrahedron*, 57, 2597-....., 2001. Faltou título e pg. final

RIBEIRO, E.M. Histologia, histoquímica e ultra-estrutura da glândula intramandibular de *Cephalotes* (= *Zacryptocerus*) *pusillus*, Andrade & Baroni, 1999 (Hymenoptera: formicidae). 2000. 74f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2000.

ROCHA, T.; CAETANO, F.H. Ultramorfolgia e histologia da glândula salivar do tórax de *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera: Vespidae). *Neotrop. Entom.* 32, 585-590, 2003.

ROCHA, T. CAETANO, F.H. Ultrastructure os salivary glands: thoracic gland of the *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera: Vespidae). *Acta Microsc.* suppl. C, Caracas, 9-10, Abstract, 2004.

RODIONOVA, N.A. and BEZBORODOV, A.M. Localization of enzyme systems that degrade cell wall polysaccharides in higher plants: pectinases (Review). *Appl. Biochem. Microb.*, 33, 415-432, 1997.

RODRIGUES, A.; CARLETTI, C.D.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. *Braz. J. Microb.* 39, 64-67, 2008.

RODRIGUES, A.R.; CABLE, R.N.; MUELLER, U.G.; BACCI JR, M. e PAGNOCCA, F.C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96, 331-342, 2009.

SANTOS, A.V.; DILLON, R.J.; DILLON, V.M.; REYNOLDS, S.E.; SAMUELS, R.I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leafcutting ant *Atta sexdens* rubropilosa. *Microb. Lett.* 239, 319–323, 2004.

SCHILDKNECHT, H., KOOB, K. Myrmicacin, the first insect herbicide. *Angew. Chemie Intern. Edition*, 10, 124–125, 1971.

SEN, R.; ISHAKA, H.D.; ESTRADA, D.; DOWD, S.E.; HONG, E. e MUELLER, U.G. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. *Proc. Nat. Acad. Scie.* 106, 17805-17810, 2009.

SHOREY, H. H. Behavioral responses to insect pheromones. *Ann. Rev. Entom.* 18, 349-380, 1973.

SILVA, E.C.M. Caracterização histoquímica das glândulas salivares de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) durante o desenvolvimento larval. 1998. 131f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

SIMON, S.; PETRÁŠEK, P. Why plants need more than one type of auxin. *Plant Scie.*, 180, 454–460, 2011.

SINGER, R. The agaricales in modern taxonomy, 4^a ed. Koenigstein: Koeltz Scientific Books, p. 477, 1986.

STRAUB SG, YAJIMA H, KOMATSU M, AIZAWA T, SHARP GWG. The effects of cerulenin, an inhibitor of protein acylation; 51, Suppl.1:S91–S95, 2002 Falta nome da revista

SOUTO, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Adv. Appl. Microb.*, 39, 213-294, 2008.

TAIZ, L. AND ZEIGER, E. Plant Physiology. 2nd edition. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 792 p., 1998.

THORNE, B.L., TRANIELLO, J.F.A.. Comparative social biology of basal taxa of ants and termites. *Ann. Rev. Entom.* 48, 283–306, 2003.

TILMAN, J.A. ; SEYBOLD, S.J.; JURENKA, R.A.; BLOMQUIST, G.J., Insect pheromones - an overview of biosynthesis and endocrine regulation, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29,48 1-5 14, 1999.

TOBIN, A.B., Wheatley M. *Methods in Molecular Biology*, 259,275–281, 2004. Falta título do trabalho e abreviar o nome da revista

VEAL, D.A.; TRIMBLE J.E.; BEATTIE, A.J. Antimicrobial properties of secretions from the metapleural glands of *Myrmecia gulosa* (the Australian bull ant). *J. Applied Bact.* 72, 108-194, 1992.

VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. Feromônios de Insetos; Biologia, química e emprego no manejo de pragas, Viçosa: UFV - Imprensa Universitária, p. 14 – 2010, 1987,.

- VIEIRA, A.S.; BUENO, O.C.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.. Secretory profile of metapleural gland cells of the leaf-cutting ant *Acromyrmex coronatus* (Formicidae: Attini). *Microsc. Res. Techn.* 74, 76-83, 2011.
- VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. Fundamentos de bioquímica. 1º Reimpressão. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 931p. 2002.
- WILSON, E.O. The social insects. Wilson, E.O, In: Sociobiology, [S.I.]: The Abridged Edition, 349p, 1987.
- WEBER, N.A. Gardening Ants: the Attines. Philadelphia, American Philosophical Society, 1972.
- YADAV, J.; KARYAKARTE TAJIMA, T.; H. Comparison of investment in nest construction by the foundresses of consubgeneric *Polistes* wasps, *Polistes (Polistes) riparius* and *P. (P.) chinensis* (Hymenoptera, Vespidae). *J. Ethol.* [SI], 16, 97-104, 1980.
- YEK, S.H. & MUELLER, U.G. The metapleural gland of ants. *Biol. Rev.* 86, 774-791, 2011.
- YODA, H.; KATAGIRI, T.; TAKABE, K. *Tetrahedron Lett.*, 32, 6771-..., 1991. Faltou título e pg final
- ZANETTI, R.; CARVALHO, G.A.; SANTOS, A.; SOUZA-SILVA, A.; GODOY, M.S. Manejo integrado de formigas cortadeiras. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002
- ZARA, F.J. Caracterização morfo-histológica, histoquímica e ultra-estrutural da porção secretora da glândula salivar do quarto estágio larval de *Neoponera villosa* (Formicidae: Ponerinae). 1998. 126f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.
- ZARBIN, P.H.G.; RODRIGUES, M.A.C.M. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. *Quím. Nova*, 32, 722-731, 2009.
- ZARBIN, P.H.G. 2001. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. In: VILELA, E.F. e DELLA LÚCIA, T.M.C. eds Feromônios de insetos: Biologia, química e aplicação. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, p.45 -50, 2003.

7. APÊNDICES