

**ANÁLISE QUÍMICA DAS GLÂNDULAS DE VENENO E METAPLEURAL
DE FORMIGAS CORTADEIRAS E ESTUDO DAS ATIVIDADES
HERBICIDA E ANTIMICROBIANA ASSOCIADAS AOS SEUS
CONSTITUINTES**

KARLA DA SILVA MALAQUIAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

**CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
FEVEREIRO DE 2010**

**ANÁLISE QUÍMICA DAS GLÂNDULAS DE VENENO E
METAPLEURAL DE FORMIGAS CORTADEIRAS E ESTUDO DAS
ATIVIDADES HERBICIDA E ANTIMICROBIANA ASSOCIADAS
AOS SEUS CONSTITUINTES**

KARLA DA SILVA MALAQUIAS

Dissertação apresentada ao Centro de
Ciência e Tecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense, como
parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Ciências Naturais.

Orientador: Prof. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda

Co-orientadora: Ana Maria Matoso Viana-Bailez

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

**CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
FEVEREIRO DE 2010**

ANÁLISE QUÍMICA DAS GLÂNDULAS DE VENENO E
METAPLEURAL DE FORMIGAS CORTADEIRAS E ESTUDO DAS
ATIVIDADES HERBICIDA E ANTIMICROBIANA ASSOCIADAS
AOS SEUS CONSTITUINTES

KARLA DA SILVA MALAQUIAS

Dissertação apresentada ao Centro de
Ciência e Tecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense, como
parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Ciências Naturais.

Aprovada em 11 de fevereiro de 2010

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Claudio Luiz Melo de Souza – ISTCA/FAETEC

Dr^a. Denise Dolores Oliveira Moreira – UENF

Prof. Dr. Omar Eduardo Bailez – UENF

Prof^a . Dr^a. Ana Maria Matoso Viana-Bailez – UENF
(Co-orientadora)

Prof. Dr. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda - UENF
(Orientador)

Aos meus pais, José Carlos e Maria das Graças. Aos meus avós, Alcendino (*in memorium*) e Maria José, que sempre me deram todo apoio.

AGRADECIMENTOS

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

À FAPERJ/UENF pela bolsa concedida.

Ao professor Paulo pela orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Ana Maria e Omar pela presteza em todos os momentos e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Dr^a Denise por toda atenção, troca de idéias e contribuição na realização deste trabalho.

Ao professor Olney pela viabilização e empenho na realização dos ensaios antimicrobianos.

À Arli por toda ajuda e boa convivência sempre.

Às amigas Gabriela, Juliana e Shênia pelo companheirismo e ajuda nas coletas noturnas das formigas.

Aos amigos Larissa, Adriana, Fernanda, Milena, Carol, Letícia e Léo pela boa convivência.

À Luciana pela ajuda nos ensaios antimicrobianos.

Aos amigos do laboratório J.Hild, Fabíola, Vitinho, Thayana, Lindomar, Paty e Almir.

Aos colegas e professores da pós-graduação do programa Ciências Naturais, e ao Edson por toda a ajuda sempre.

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

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

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte."

Albert Einstein

RESUMO

Formigas cortadeiras são consideradas os insetos mais derivados do planeta. A eficiência no forrageamento e manutenção das condições assépticas das colônias são fatores fundamentais do sucesso ecológico destas formigas. Tais fatos sugeriram uma investigação de uma possível capina química, realizada por constituintes de glândulas exócrinas, nas trilhas de forrageamento e nos jardins de fungo. No Capítulo I investigou-se a possibilidade dos constituintes presentes na glândula de veneno, usada para marcação de trilha química, estarem atuando como herbicida. Desta forma além de agir como feromônio de trilha, estas substâncias também impediriam o crescimento de vegetação na área de atuação do feromônio. O efeito do extrato da glândula de veneno e da 3-etil-2,5-dimetilpirazina, principal componente do feromônio de trilha de *Atta sexdens rubropilosa*, foi avaliado em comparação ao herbicida comercial Alaclor[®]. Para realização do bioensaio foram utilizadas sementes de alface. Estas foram pré-germinada por 72h e posteriormente 35 plântulas foram separadas e postas em placas de Petri. Em cada placa foi aplicado um tratamento. Verificou-se que o extrato da glândula de veneno apresenta atividade herbicida comparável ao Alaclor[®]. As análises químicas do extrato ainda indicam a presença de substâncias que não foram descritas como presentes na glândula de veneno desta espécie até o momento. No Capítulo II foi analisada a atividade antimicrobiana do extrato da glândula metapleuraleal de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Para o bioensaio foi utilizado o meio nutritivo BHI. Foram realizados três tratamentos, em triplicata, o controle positivo (onde somente o inóculo estava presente); controle negativo (controle DMSO) e o tratamento contendo o extrato da glândula metapleuraleal. Os inóculos testados foram: duas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Beauveria bassiana*. Sobre os fungos *C. albicans* e *B. bassiana* os resultados indicam efeito fungicida. Sobre as bactérias *S. aureus* e *E. coli* o efeito observado foi estático. As análises químicas do extrato indicam a presença de ácidos assim como outros compostos voláteis.

PALAVRAS-CHAVE: Ecologia química; formigas-cortadeiras; glândula de veneno; glândula metapleuraleal; atividades herbicida e antimicrobiana.

ABSTRACT

Leaf-cutting ants are considered the highest derived insects in the planet. Foraging performance and colonies antiseptic maintenance are fundamental factors of the ecological success of these ants. Such facts suggested an investigation of a possible assistance exerted by chemical constituents of exocrine glands, in both activities: trail foraging and fungus gardening. In Chapter I we investigate the hypothesis of venom gland constituents, used to demarcate foraging trails, possess herbicide activity. Thus, although it is well known that this gland contain trail pheromone, it is supposed that these substances, or another ones, would also prevent vegetation growth in the foraging trail. *Atta sexdens rubropilosa* venom gland extract and also 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine (its pheromone trail major component) effects was evaluated and compared with commercial herbicide Alachlor[®]. For bioassay were used lettuce seeds. These were pre-germinated for 72 hours and then 35 seedlings were separated and placed in Petri dishes. Each plate was applied a treatment. We verified that venom gland extract had herbicide activity as high as Alachlor[®]. The chemical analyses of these extracts also indicated the presence of two new substances that have not been described yet in the venom gland of this species. In the Chapter II antibiotic activity of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* metapleural glands extracts was analyzed. The extract was evaluated against two fungus species and the results indicate fungicide effect. Against bacteria the observed effect was bacteriostatic. Chemical analyses of the extract indicate the presence of carboxylic acids as well another volatile compounds.

KEYWORDS: chemical ecology, leaf-cutting ants, venom gland; metapleural gland; herbicide and antimicrobial activities.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Classificação dos semioquímicos de acordo com o tipo de interação. Os sinais (+) e (-) significam benefício e custo na interação, respectivamente. O primeiro sinal refere-se ao organismo emissor enquanto o segundo ao receptor do sinal. **6**
- Figura 1.2** - Esquema representativo das diferentes castas de formigas cortadeiras do gênero *Atta*. **11**
- Figura 1.3** - Representação esquemática de glândulas comuns em formigas cortadeiras. Na cabeça estão as glândulas pós-faringeana (1) e mandibular (2); no tórax as glândulas labial (3) e metapleurais (4); no abdômen as glândulas de veneno (5) e glândula de Dufour (6). **16**
- Figura 1.4** - Trilha da formiga cortadeira *A. sexdens rubropilosa* (a); operária realizando corte (b); operárias retornando ao olheiro com os fragmentos vegetais (c), jardim do fungo simbiote (d). **19**
- Figura 1.5** - Compostos presentes no feromônio de trilha em formiga cortadeira dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*: 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (**1**) e 3-etil-2,5-dimetilpirazina (**2**). **20**
- Figura 1.6** - Simbiose existente entre formigas e seus jardins de fungo. Atualmente são caracterizados cinco indivíduos nesta interação: 1) formigas cultivadoras de fungo da tribo Attini; 2) fungo simbiote; 3) bactérias do gênero *Pseudonocardia*; 4) fungo entomopatogênico *Escovopsis*; 5) leveduras negras. **21**
- Figura 1.7** - Estrutura do Candicina D. **22**
- Figura 1.8** - 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. **23**
- Figura 2.1** - Estrutura dos compostos pirrólicos inibidores da imidazol-glicerol-fosfato-desidratase (IGPD) e do composto presente no feromônio de trilha de formigas cortadeiras. **46**
- Figura 2.2** - Estrutura básica do inibidor fotossintético derivado de pirazina e estruturas das pirazinas presentes no feromônio de trilha. **47**

- Figura 2.3** - *Devil's gardens* estabelecidos por *Myrmelachista schumanni* pela inibição do crescimento de qualquer planta diferente de *Duroia Hirsuta*, na qual fazem ninhos. **(a)** Um exemplo de *Devil's garden*, onde é possível observar a monocultura de árvores de *Duroia Hirsuta* que apresentam menor porte, em contrastes com a diversificada floresta tropical ao fundo; **(b)** Operária de *Myrmelachista schumanni* atacando uma planta invasora, primeiramente a formiga faz um pequeno corte no tecido vegetal, e então insere a ponta do abdômen no corte para injetar o ácido fórmico; **(c)** Com a ação do herbicida as folhas desenvolvem necroses que ocasionam a morte da planta. **48**
- Figura 2.4** - Estrutura do ácido pirazino-2-carboxílico **(8)**. **49**
- Figura 2.5** - Esquema representativo delineamento experimental montado no sistema inteiramente casualizado do biensaio de atividade herbicida do extrato da glândula de veneno de *Atta sexdens rubropilosa*. São mostrados os constituintes dos tratamentos e a concentração em que foram aplicados. **52**
- Figura 2.6** - Massa seca de plântulas de alface, *Lactuca sativa*, após serem acometidos à BOD por 120h. O resultado refere-se à aplicação dos tratamentos na concentração de 0,1 mg·mL⁻¹. Letras distintas indicam diferença significativa no teste de Tukey (p < 0,01). **56**
- Figura 2.7** - Plântulas de *Lactuca sativa* referente à aplicação dos tratamentos na concentração de 0,1mg/ml após 120h do início do bioensaio. **57**
- Figura 2.8** - Cromatograma total de íons obtido pela técnica de cromatografia gasosa aliada à espectroscopia de massas para o extrato da glândula de veneno, com indicação dos sinais cujas estruturas foram sugeridas. **59**
- Figura 2.9** - Análise cromatográfica do extrato da glândula de veneno pela ionização por *electrospray*. **60**
- Figura 2.10** - Constituintes da glândula de veneno de *Atta sexdens rubropilosa* identificados por CROSS *et alii* (1979). **61**
- Figura 2.11** - Fragmentos iônicos mais intensos presentes no espectro MS-ESI referente a 3-etil-2,5-dimetilpirazina. **63**
- Figura 2.12** - Provável fragmentação observada no cromatograma de CG-EM para os íons mais intensos do pirrol **(1)**. **63**
- Figura 2.13** - Comparação entre os fragmentos que apresentam maior porcentagem em relação ao pico base para 2-acetil-3,5-dimetilpirazina e benzoato de metila. **64**

- Figura 2.14** - Comparação entre os espectros de massas obtidos experimentalmente (parte superior) e o espectro do benzoato de etila padrão (parte inferior). **64**
- Figura 2.15** - Estruturas dos fragmentos iônicos mais intensos sugeridas para o aduto por ESI-MS $[M + H]^+$ 151. **65**
- Figura 2.16** - Espectro de fragmentação do aduto de ESI-MS $[M + H]^+$ =167, assim como as estruturas sugeridas para os fragmentos iônicos mais intensos. **67**
- Figura 2.17** - Espectro de fragmentação do aduto de ESI-MS $[M + H]^+$ =153, assim como as estruturas sugeridas para os fragmentos iônicos mais intensos. **67**
- Figura 3.1** - Representação esquemática da montagem do bioensaio em *Candida albicans*; para cada tratamento foram feitas três repetições (ensaio em triplicata). **89**
- Figura 3.2** - Efeito do extrato da glândula metapleural sobre *Beauveria bassiana* (CG 24) em cultivo “*in vitro*” às 39, 43, 47, 51, 55 e 64 horas (a 28°C) × Densidade Óptica 510nm. As diferenças estatísticas de médias foram obtidas pelo teste de Tukey em nível de 1% de probabilidade. Letras distintas indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,01$). **92**
- Figura 3.3** - Curva de regressão polinomial da atividade do extrato da glândula metapleural sobre o crescimento de *Beauveria bassiana* (CG 24) “*in vitro*”, expressada pela relação Tempo de incubação × Densidade Óptica 510nm. **93**
- Figura 3.4** - Ensaio de contagem de Unidades Formadoras de Colônias de *Beauveria bassiana* pela metodologia de diluições. a) Comparações entre os tratamentos na diluição 1×10^{-1} ; b) Comparações entre os tratamentos na diluição 1×10^{-2} e c) Comparações entre os tratamentos na diluição 1×10^{-3} . **94**
- Figura 3.5** - Microscopia óptica de uma lâmina com hifas de *Beauveria bassiana*, aumento 1000 ×, de amostras tratadas com extrato da glândula metapleural (a); e seu controle (b); e ampliação dos conídios (c) que estão ausentes no tratamento (a). **95**
- Figura 3.6** - Efeito do extrato da glândula metapleural sobre *Candida albicans* (ATCC 20231) em cultivo “*in vitro*” às 8, 15, 17, 19 e 21 horas (a 37°C) × Densidade Óptica 510nm. As diferenças estatísticas de médias foram obtidas pelo teste de Tukey em nível de 1% de probabilidade. Letras distintas indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,01$). **96**
- Figura 3.7** - Curva de regressão polinomial da atividade do extrato da glândula metapleural sobre o crescimento de *Candida albicans* (ATCC 20231) “*in vitro*”, expressada pela relação Tempo de incubação × Densidade Óptica 510nm. **97**

- Figura 3.8** - Ensaios de contagem de Unidade Formadoras de Colônias de *Candida albicans* pela metodologia de diluições. Comparações entre os tratamentos na diluição 1×10^{-1} . **97**
- Figura 3.9** - Efeito do extrato da glândula metapleural sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 3359) em cultivo “*in vitro*” às 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas (a 37°C) × Densidade Óptica 510nm. As diferenças estatísticas de médias foram obtidas pelo teste de Tukey em nível de 1% de probabilidade. Letras distintas indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,01$). **99**
- Figura 3.10** - Curva de regressão polinomial da atividade do extrato da glândula metapleural sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 3359) “*in vitro*”, expressada pela relação Tempo de incubação × Densidade Óptica 510nm. **100**
- Figura 3.11** - Efeito do extrato da glândula metapleural sobre *Staphylococcus aureus* (LSA 88) em cultivo “*in vitro*” às 2, 3, 4, 5 e 6 horas (a 37°C) × Densidade Óptica 510nm. As diferenças estatísticas de médias foram obtidas pelo teste de Tukey em nível de 1% de probabilidade. Letras distintas indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,01$). **101**
- Figura 3.12** - Curva de regressão polinomial da atividade do extrato da glândula metapleural sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* (LSA 88) “*in vitro*”, expressada pela relação Tempo de incubação × Densidade Óptica 510nm. **102**
- Figura 3.13** - Efeito do extrato da glândula metapleural sobre *Escherichia coli* (ATCC 25922) em cultivo “*in vitro*” às 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas (a 37°C) × Densidade Óptica 510nm. As diferenças estatísticas de médias foram obtidas pelo teste de Tukey em nível de 1% de probabilidade. Letras distintas indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,01$). **103**
- Figura 3.14** - Curva de regressão polinomial da atividade do extrato da glândula metapleural sobre o crescimento de *Escherichia coli* (ATCC 25922) “*in vitro*”, expressada pela relação Tempo de incubação × Densidade Óptica 510nm. **104**
- Figura 3.15** - Cromatograma total de íons obtido pela técnica de cromatografia gasosa aliada à espectroscopia de massas para o extrato da glândula metapleural, com indicação dos sinais cujas estruturas foram sugeridas. **105**
- Figura 3.16** - Análise cromatográfica do extrato da glândula metapleural pela ionização por *electrospray*. **106**
- Figura 3.17** - Estruturas sugeridas pela biblioteca do programa como alguns dos constituintes do extrato da glândula metapleural. **107**
- Figura 3.18** - Provável fragmentação observada no cromatograma de CG-EM para a 2-nonanona (**12**). **108**

- Figura 3.19** - Provável fragmentação observada no cromatograma de CG-EM **108** para o 4-oxodecanoato de metila (**14**).
- Figura 3.20** - Espectro de massas experimental do composto de maior **109** intensidade no cromatograma total de íons (X).
- Figura 3.21** - Espectro de massas ESI(-)MS experimental do aduto $[M + H]^+$ de **110** massa 185,1075 .
- Figura 3.22** - Estrutura dos Hidroxiácido: (4) identificado na glândula **110** metapleuraral de *A. octospinosus* (15) sugerido através dos espectros experimentais.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|------------|
| Tabela 1.1 - Principais feromônios de ação desencadeadora e ação comportamental desencadeada. | 8 |
| Tabela 1.2 - Iscas tóxicas granuladas existentes no mercado: grupo químico a que pertencem, estrutura do princípio ativo, marca comercial, e modo de ação sobre formigas cortadeiras. | 13 |
| Tabela 1.3 - Estrutura química de compostos identificados na glândula metapleurale de formigas cortadeiras que estão relacionados a defesa química contra patógenos. | 26 |
| Tabela 2.1 - Número de glândulas de veneno e as respectivas concentrações estimadas para cada extrato preparado. | 50 |
| Tabela 2.2 - Médias de massa seca das plântulas de alface tratadas com diferentes compostos nas concentrações de 0,1; 0,01; 0,001 e 0,0001 mg·mL ⁻¹ e os respectivos valores de desvio padrão (SD). | 55 |
| Tabela 2.3 - Médias do comprimento radicular das plântulas de alface tratadas com diferentes compostos nas concentrações de 0,1; 0,01; 0,001 e 0,0001 mg·mL ⁻¹ , no início e no fim (120h) do bioensaio (0h), assim como os respectivos valores de desvio padrão (SD). | 56 |
| Tabela 2.4 - Sinais presentes no espectro de massas do extrato da glândula de veneno, com os respectivos tempos de retenção e nome sugerido para os compostos. | 60 |
| Tabela 2.5 - Prováveis fragmentações no espectrômetro de massas (EM-IE) para a 2,5-dimetilpirazina (2). | 62 |
| Tabela 3.1 - Sinais presentes no espectro de massas do extrato da glândula metapleurale, com os respectivos tempos de retenção e anexo correspondente. | 106 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| AChe | Acetilcolinesterase |
| ANOVA | Análise de variância |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| BOD | Biochemical oxygen demand |
| CG-EM | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DO | Densidade óptica |
| EGM | Extrato da glândula metapleural |
| EGV | Extrato da glândula de veneno |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| GM | Glândula metapleural |
| GV | Glândula de veneno |
| IGPD | Imidazol-glicerol-fosfato-desidratase |
| ESI-MS | Electrospray Spectrometry Ionization - Mass Spectrometry |
| SARM | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina |
| SD | Standard deviation |
| TOF | Time-of-flight |
| UFCs | Unidades formadoras de colônias |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS SOBRE A ECOLOGIA E A BIOLOGIA DE FORMIGAS CORTADEIRAS | 4 |
| Comunicação Química | 5 |
| Aspectos Gerais de Formigas Cortadeiras | 9 |
| Glândulas Exócrinas de Formigas Cortadeiras | 15 |
| Forrageamento | 17 |
| Assepsia nas Colônias de Formigas Cortadeiras | 20 |
| Técnicas Analíticas Aplicadas à Identificação Estrutural de Semioquímicos | 28 |
| Referências | 31 |
| CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE HERBICIDA DOS CONSTITUINTES DO FERÔMONIO DE TRILHA DE <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) | 43 |
| Introdução | 44 |
| Material e Métodos | 50 |
| Resultados e Discussão | 55 |
| Conclusão | 69 |
| Referências | 70 |
| Apêndices | 75 |
| CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DA GLÂNDULA METAPLEURAL DE <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) | 83 |
| Introdução | 84 |
| Material e Métodos | 87 |
| Resultados e Discussão | 92 |
| Conclusão | 113 |
| Conclusões Finais e Perspectivas | 114 |
| Referências | 117 |
| Apêndices | 123 |

INTRODUÇÃO

Os insetos sociais são formidáveis pela eficiência e super-organização de suas colônias. Dentre eles, as formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* merecem destaque, em virtude do elevado nível de derivatização. Estas formigas encontraram uma fonte alimentar praticamente inesgotável, oriunda da associação mutualística com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. O fungo é cultivado dentro das colônias em folhas frescas que servem como substrato. Devido o corte indiscriminado de mono e dicotiledôneas, estas formigas são consideradas praga severa à agricultura.

A atividade de forrageamento em grupo é uma grande vantagem da vida social. A eficiência na exploração da fonte alimentar possibilita a maior aquisição de recursos que serão usados para a manutenção e ampliação da sociedade. Formigas cortadeiras fazem uso de trilhas químicas para marcar o caminho entre a colônia e a fonte de alimento que será explorada pelas operárias. As substâncias depositadas na trilha são chamadas de feromônio de trilha e são estocadas na glândula de veneno. Estas trilhas têm como característica o fato de permanecerem livres de vegetação. Qualquer empecilho na área onde transitam as operárias que levam os fragmentos vegetais ao ninho pode reduzir a eficiência no forrageamento. Logo é possível pensar que o feromônio de trilha, ou outro constituinte da glândula de veneno, possa ter uma dupla função. Além de guiar as formigas do ninho até a fonte de alimento, também apresenta uma ação herbicida. Desta forma inibiria o crescimento de vegetação na área de atuação do feromônio. Esta hipótese foi avaliada no Capítulo I onde a atividade herbicida dos constituintes da glândula de veneno de *Atta sexdens rubropilosa* foi analisada. O uso desta capina química, que pode estar relacionada aos constituintes desta glândula, geraria ganho energético para as formigas. Uma vez que tal mecanismo facilitaria o deslocamento por trilhas livres de obstáculos sem a necessidade de realizar constantemente a capina mecânica.

As formigas cultivam apenas um tipo de fungo que constitui a principal fonte de alimento na dieta das larvas e complementa a alimentação das operárias. As câmaras de fungo ficam no solo, ambiente microbiológico rico e diversificado que facilita a contaminação da monocultura por outros microorganismos. Além disso, há um elevado número de indivíduos geneticamente próximos vivendo em espaço delimitado dos ninhos. O que torna estas condições muito apropriadas para a disseminação de agentes patogênicos. A prática da agricultura foi primordial para que as formigas cortadeiras viessem a ser consideradas herbívoros dominantes entre os insetos sociais. Dentro das câmaras onde o fungo é cultivado, qualquer microorganismo indesejado é eliminado por comportamentos de limpeza bem específicos, como o *grooming*. Frente a uma contaminação, por fungo ou bactéria que seja prejudicial, estas formigas fazem uso de substâncias químicas que podem ser comparadas à defensivos agrícolas, para proteger o jardim do fungo simbiote. Estas substâncias são produzidas, principalmente, na glândula metapleurálica. No capítulo II a atividade antimicrobiana da glândula metapleurálica de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* foi avaliada.

A natureza química dos compostos presentes nas glândulas de veneno e metapleurálica também foram estudadas. A técnica analítica mais difundida para a análise de semioquímicos é a cromatografia gasosa aliada à espectroscopia de massas (CG-EM). Neste trabalho além desta técnica também foi usada a espectroscopia com ionização por *electrospray*. O princípio básico de análise para as duas técnicas é o mesmo, sendo que o processo de ionização da amostra será diferente. Enquanto na CG-EM a ionização ocorre por impacto de elétrons acelerados, na ionização por *electrospray* há uma transferência de íons pré-existentes em solução para a fase gasosa. Assim, a vantagem é que o composto não necessita ser volátil e termicamente estável até um limite de temperatura, que constitui a principal limitação da CG-EM. Por *electrospray* é possível analisar substâncias pouco voláteis e polares, características de grande parte dos processos químicos e bioquímicos que ocorrem em fase líquida.

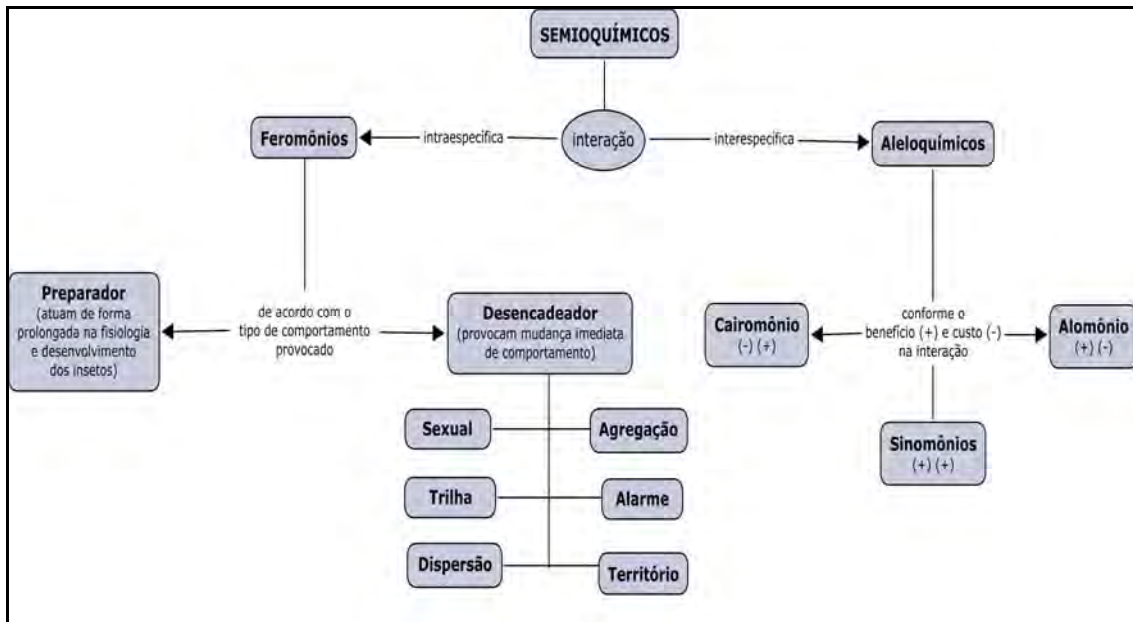
Formigas cortadeiras são pragas e acarretam elevados prejuízos ao setor agro-florestal. O controle é feito principalmente com iscas tóxicas à base de composto clorado e fluorados, que são poluentes persistentes no meio ambiente. Conhecer detalhadamente aspectos da ecologia e biologia destes insetos, assim como substâncias envolvidas na integração das colônias é fundamental para se alcançar sucesso em uma forma de controle alternativo ou que venha minimizar os efeitos nocivos do controle químico no meio ambiente.

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS SOBRE A ECOLOGIA E A BIOLOGIA DE FORMIGAS CORTADEIRAS

COMUNICAÇÃO QUÍMICA

A comunicação é um processo que envolve a transmissão de sinais entre os organismos. Os insetos usam quatro diferentes modos de comunicação: visual, auditivo, tátil e químico. A predominância de um destes sinais em relação aos demais depende de fatores como o habitat e o modo de vida da espécie (FERREIRA *et alii*, 2001). Alguns insetos usam principalmente a comunicação química e entre estes destacam-se os insetos sociais. Através da comunicação química mensagens bem específicas são transmitidas entre indivíduos de uma mesma espécie ou de espécies diferentes. A comunicação química é mediada por substâncias chamadas semioquímicos. Esta palavra é derivada do grego *semeion* que significa marca ou sinal. Os semioquímicos são divididos em dois grupos: aleloquímicos (do grego *allelon*, de um para outro, relação recíproca) quando estas interações são interespecíficas; e em feromônios (do grego *phereum*, carregar; e *hormon*, estimulado ou excitado) quando atuam em relações intraespecíficas (NORDLUND & LEWIS, 1976). Em função da mudança comportamental e/ou fisiológica que estes compostos provocam, aleloquímicos e feromônios são classificados de acordo com o esquema abaixo, Figura 1.1



FONTE: Ferreira *et alii*, 2001.

Figura 1.1 - Classificação dos semioquímicos de acordo com o tipo de interação. Os sinais (+) e (-) significam benefício e custo na interação, respectivamente. O primeiro sinal refere-se ao organismo emissor enquanto o segundo ao receptor do sinal.

Aleloquímicos aparecem mediando interações entre organismos em diferentes níveis tróficos. Com relação ao custo ou benefício destes organismos na comunicação podem ser descritos como:

- a) **Cairomônios:** sinais químicos que, quando percebidos por um indivíduo de outra espécie, provocam uma resposta fisiológica e/ou comportamental benéfica ao receptor, mas não ao organismo emissor. Muitos são usados por predadores para encontrar a presa. Por exemplo, o feromônio sexual produzido pela praga do algodão *Heliothis virescens* (lagarta-da-maçã) também é um atrativo a um de seus inimigos naturais, o parasitóide *Cardiochiles nigriceps* (VICKERS *et alii*, 1991).
- b) **Alomônios:** sinais químicos que favorecem somente o emissor. Estes compostos são comumente usados como mecanismo de defesa. Um exemplo é o ácido fórmico usado por operárias da espécie *Formica* contra invasores (TAGUCHI *et alii*, 1998).

- c) Sinomônios: sinais químicos que causam uma resposta comportamental e/ou fisiológica adaptativamente favorável tanto ao organismo emissor como ao receptor. Um exemplo típico são os odores florais associados à polinização (SAKAI, 2002).

Feromônios são substâncias ou mistura de substâncias químicas que provocam mudanças fisiológicas e/ou comportamentais intraespecíficas (NORDLUND & LEWIS, 1976).

Sinais emitidos por meio de feromônios podem atuar de forma prolongada na fisiologia e desenvolvimento dos insetos, neste caso são denominados “preparadores”. Um exemplo que ocorre em insetos sociais é a “substância da rainha”, produzida pela rainha da abelha melífera *Apis mellifera*, que impede o desenvolvimento de ovários nas operárias (BUTLER, 1954 *apud* MOTA & CRUZ-LANDIN, 1988).

Os sinais também podem provocar mudança imediata no comportamento dos indivíduos, sendo assim denominados “desencadeadores” (SHOREY, 1973). Os principais feromônios de efeito desencadeador são os feromônios de alarme, sexuais, de agregação, de marcação de território, de marcação de trilha, e de oviposição, Figura 1.1. Alguns destes comportamentos são descritos na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Principais feromônios de ação desencadeadora e ação comportamental desencadeada.

| Tipo de Feromônio | Mudança comportamental ocasionada |
|-------------------------------|---|
| Agregação | Atraem um elevado número de indivíduos para vencer a resistência do hospedeiro. Ocorrência comum em escolitídeos, mas também ocorrem em outros coleópteros (besouros), em diversos himenópteros sociais (formigas e abelhas), e em blatídeos (baratas). |
| Alarme | Produzem um estado de alerta pela aproximação de algum predador natural, desencadeando o comportamento de defesa na colônia. São muito comuns em insetos sociais: Hymenoptera (abelhas e formigas) e Isoptera (cupins). |
| Marcação de território | São usados para a marcação e reconhecimento do próprio território de exploração, garantindo à colônia o alimento e a defesa. São encontrados em diversas espécies de formigas, incluindo as formigas cortadeiras de folhas como <i>Atta cephalotes</i> e <i>A. sexdens rubropilosa</i> . |
| Oviposição | Demarcam o local onde os ovos foram depositados e também são utilizados pelas fêmeas para desencorajar a postura de ovos por outras fêmeas no mesmo sítio, diminuindo a competição entre as larvas por alimento. A maioria dos feromônios de oviposição ocorre nas espécies de moscas-das-frutas e algumas mariposas. |
| Sexuais | São emitidos com a finalidade de reprodução, uma vez que são usados para atrair o sexo oposto e assim aumentam a probabilidade de sucesso no acasalamento dos insetos. Os feromônios sexuais, na grande maioria dos casos, são produzidos pelas fêmeas que liberam compostos voláteis de uma glândula especializada, que no caso de lepidópteros encontra-se tipicamente localizada na ponta do abdome. |
| Trilha | Orientam os indivíduos até a fonte de alimentos e também são usados na exploração de novas áreas. São comumente encontrados em Formicidae (formigas) e Isoptera (cupins). |

FORTE: VILELA & DELLA LÚCIA, 2001.

Os feromônios despontam como uma alternativa promissora no controle alternativo de insetos-praga. As grandes vantagens da utilização destes compostos é que eles são específicos, pouco tóxicos, podem ser usados em quantidades mínimas e são biodegradáveis quando comparados aos pesticidas sintéticos (ZARBIN, 2001). Assim, a utilização destes representa uma técnica menos prejudicial ao ecossistema.

Os feromônios podem ser usados como atraentes em armadilhas, o que permite o monitoramento da ocorrência de um determinado inseto-praga. Desta forma, é possível tomar as devidas providências de controle, ou seja, se há necessidade de pulverizações, bem como quando e quanto aplicar. Além disso, o feromônio pode ser utilizado na redução de populações através de coleta massal, da técnica de confundimento, e também na avaliação de níveis de resistência a inseticidas em populações de pragas (BENTO, 2001). A utilização de feromônios na agricultura como forma de monitoramento populacional, ou em armadilhas de captura de insetos, é hoje uma realidade cada vez maior, tanto no Brasil como no exterior (ZARBIN & RODIGUES, 2009).

ASPECTOS GERAIS DE FORMIGAS CORTADEIRAS

As formigas estão presentes praticamente em todos os ecossistemas terrestres (DELLA LUCIA *et alii*, 2001), sendo capazes de ocupar nichos diferenciados onde são dominantes em relação à biomassa animal (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Estes insetos apresentam um alto grau de organização social, e baixa taxa de extinção quando comparada a outros grupos de animais. Indicando que são mais adaptáveis às mudanças de seu *habitat* e do clima do planeta (WILSON, 1987). Segundo Schultz (2000), é provável que 15 a 20% da biomassa terrestre animal seja de formigas. Sendo que este valor é ainda maior, em torno de 25%, nas regiões tropicais nas quais são mais abundantes.

As formigas pertencem à classe Insecta, ordem Hymenoptera, e todas estão reunidas em uma única família: a Formicidae. Dentro da subfamília Myrmicinae a tribo Attini reúne as formigas cultivadoras de fungo, e entre essas são consideradas formigas cortadeiras as espécies do gênero *Atta*, popularmente conhecidas como *saúvas*, e do gênero *Acromyrmex*, conhecidas como *quenquéns*. Elas são conhecidas pelo dano que ocasionam a um grande número de espécies vegetais e pelo prejuízo econômico causado à agricultura

(DELLA LUCIA, 1993 e BERTI FILHO *et alii*, 1992). Estes insetos estão distribuídos desde o sul dos Estados Unidos até a região central da Argentina, não ocorrendo nas regiões transandinas da América do Sul e nem algumas ilhas das Antilhas (FARJI-BRENNER & RUGGIERO, 1994). O Brasil é o país que possui o maior número de espécies de saúvas na América do Sul, seguido pela Argentina e Paraguai.

Formigas cortadeiras acarretam sérios prejuízos na agricultura e silvicultura brasileira, com maiores danos as espécies de *Eucalyptus* e *Pinus* (BOARETTO & FORTI, 1997). Quase todas as culturas são atacadas e danificadas pelas formigas que cortam as folhas e brotos, podendo destruir completamente as plantas. Estima-se que somente as espécies de *Atta* são responsáveis pelo corte de aproximadamente 15% das folhas produzidas nas florestas tropicais da América e por isso são considerados os herbívoros dominantes na Região Neotropical (CHERRET, 1986 *apud* HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Levantamentos comprovam que densidades acima de 30 formigueiros-ha⁻¹ de *Atta laevigata* podem reduzir a produção de madeira-ha⁻¹ em mais de 50% em plantios de *Pinus caribaea* com menos de 10 anos de idade (HERNÁNDEZ & JAFFÉ, 1995). Densidades acima de 80 saúveiros-ha⁻¹ podem causar uma redução de mais de 50% na produção de madeira de *Eucalyptus spp.* no corte de 84 meses (ZANETTI, 2002).

Segundo Mayhé-Nunes (1995), são 15 as espécies do gênero *Atta*, e 29 do gênero *Acromyrmex*. Algumas destas espécies são consideradas economicamente importantes (HERNÁNDEZ & JAFFÉ, 1995), por se tornarem pragas em áreas cultivadas. No Brasil, Boaretto e Forti (1997) consideraram economicamente importantes cinco espécies de *Atta* (*Atta bisphaerica*, *A. capiguara*, *A. cephalotes*, *A. laevigata* e *A. sexdens*) e nove espécies de *Acromyrmex* (*A. crassispinus*, *A. heyery*, *A. lundii*, *A. laticeps*, *A. lobicornis*, *A. octospinosus*, *A. rugosus*, *A. striatus*, *A. subterraneus*).

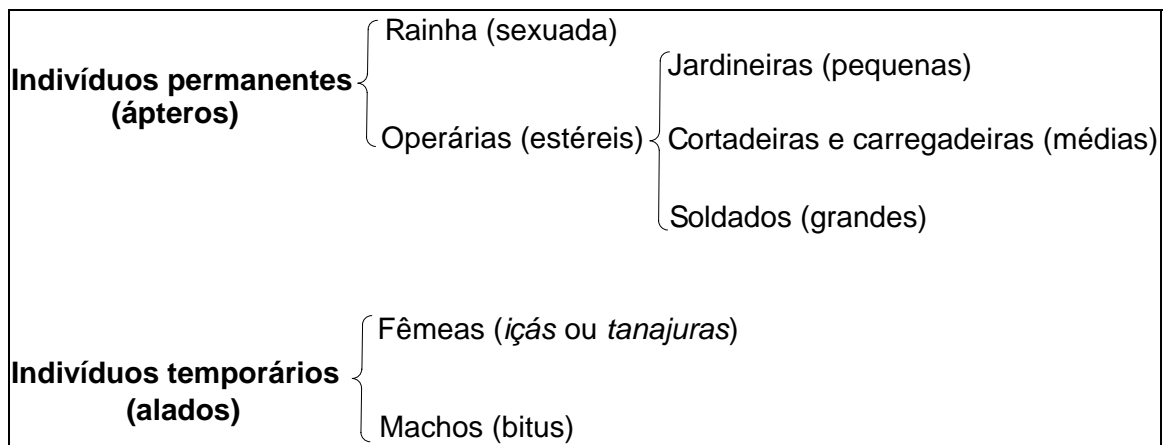
As formigas cortadeiras também apresentam aspectos positivos ao meio ambiente. Elas podam a vegetação estimulando o crescimento de algumas plantas, decompõem rapidamente o material vegetal e arejam o solo (HAINES,

1978). Estudos recentes mostram que as saúvas podem favorecer o sequestro de carbono no solo (SOUTO *et alii*, 2008).

Estes insetos são ditos eussociais, classificação atribuída pelos seguintes fatores:

- Sobreposição de duas ou mais gerações de adultos dentro de um mesmo grupo.
- Divisão de tarefas, em que cada casta realiza sua função e apenas um número restrito de indivíduos é responsável pela reprodução;
- Cuidado da prole e cooperação entre companheiras de ninho, sendo seus indivíduos considerados altruístas.

A população das formigas cortadeiras é dividida em castas permanentes e temporárias. Nas operárias há um elevado grau de polimorfismo, onde as castas têm tamanho e atividades diferenciados dentro da colônia, Figura 1.2. No gênero *Acromyrmex* o polimorfismo é menos acentuado se comparado com o gênero *Atta* (FOWLER *et alii*, 1986).



FONTE: DELLA LUCIA (1993).

Figura 1.2 - Esquema representativo das diferentes castas de formigas cortadeiras do gênero *Atta*.

De forma geral, os indivíduos estéreis da casta permanente desenvolvem as seguintes tarefas: operárias jardineiras são os menores indivíduos da colônia, e a estas cabe a tarefa de cultivar o fungo simbiote e

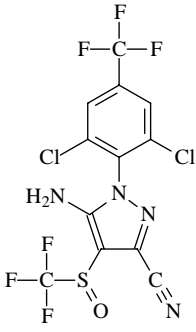
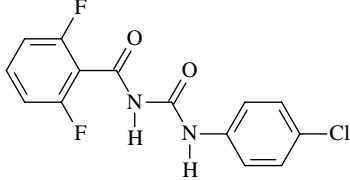
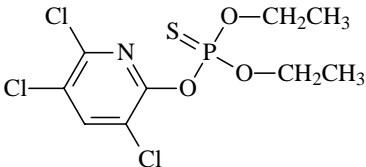
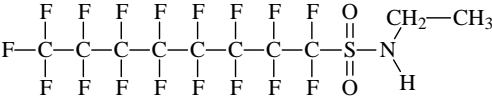
prestar assistência à rainha. Os soldados são os maiores indivíduos no ninho, excetuando a rainha, e são dedicados à defesa das colônias. As cortadeiras têm tamanho intermediário entre jardineiras e soldados e sua função é o corte e transporte do material vegetal para o ninho. Já a rainha tem função específica da postura de ovos (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

Vários estudos relatam a relação de simbiose existente entre as formigas cortadeiras e seu fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (SINGER, 1986, FISHER *et alii* 1994 e MULLER *et alii*, 2005). Os fragmentos vegetais cortados e levados para os ninhos não são consumido diretamente pelas formigas. Estes são constituídos por polímeros e servem como substrato para o desenvolvimento da cultura de fungo (RODIONOVA & BEZBORODOV, 1997). O fungo, por sua vez, produz enzimas digestivas e nutrientes que são facilmente assimilados pelas formigas (ERTHAL *et alii*, 2007). O fungo é o único alimento das larvas e complementa a dieta das operárias e rainhas (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Esta relação perdura por cerca de 45-65 milhões de anos, e há indícios que esta coevolução gerou uma interdependência entre formigas *attines* e o fungo simbiote, de modo que ambos não sobrevivem isoladamente (CURRIE, 2001 e MUELLER *et alii*, 2005).

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⁻¹ de iscas tóxicas no combate de formigas cortadeiras (BOARETTO & FORTI, 1997). Na Tabela 1.2 são mostrados os princípios ativos das principais iscas disponíveis no mercado, bem como o modo de ação destas.

Tabela 1.2 - 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 | Estrutura do princípio ativo | Marca comercial | Ação toxicológica |
|---|---|---|--|
| Fenilpirazol (Fipronil) |  | Blitz | Inibidor reversível do receptor GABA (ácido gama-aminobutírico) |
| Benzoiluréia (Diflubenzuron) |  | Formilin 400 | Inibição da síntese de quitina durante o estágio imaturo do inseto |
| Fosforado (Clorpirifós) |  | Pyrinex; Pik-isca; Pikapau; Attafós; KI-Isca; Nitrosin; Landrin; Urutu-Ag; Tatu; Formifós; Iskatoks | Inibidor da AChE (acetilcolinesterase) |
| Sulfonas Fluoralifáticas (Sulfluramida) |  | Mirex-S; Attamex-S; Pikapau-S; Tamanduá; Bandeira-S; Dinagro-S; Agripec; Fluramin. | Inibição de ATP na fosforilação oxidativa |

FONTE: BOARETTO & 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 que define, em última instância, a eliminação total das substâncias consideradas poluentes orgânicos persistentes. A convenção possui um comitê composto por especialistas. Eles analisam a substância para saber se pode ser classificada como poluente orgânico e decidem se esta vai entrar nos Anexos A, B ou C. No Anexo A estão as substâncias que devem ser eliminadas; no

Anexo B, as substâncias que estão com restrição; no Anexo C estão as substâncias nocivas obtidas de maneira não intencional.

A sulfluramida foi analisada pelo comitê do ponto de vista físico-químico, onde foi comprovado que esta era poluente orgânico. Outros países foram convidados a enviar informações sobre o perfil de risco da substância e concluíram que o risco existente exigia uma ação global, e desta forma a entrada dos PFOS na lista de produtos de uso proibido da convenção de Estocolmo, no anexo A. Na Convenção de Estocolmo, realizada em maio de 2009, ficou definida a entrada do Mirex no anexo A, por ser considerado um poluente orgânico persistente. Além disto, a Sulfluramida possui alternativa de uso disponível. Outros formicidas, como iscas à base de Diflubenzuron, Fipronil e Clorpirifós, podem substituí-la (RIBEIRO, 2009).

Os aspectos econômicos e ambientais têm levado as empresas a buscar novas alternativas, além de aperfeiçoar as técnicas de controle químico empregado (THOMAS, 1990). Uma delas poderia ser a utilização de feromônios que causem a desorganização do sistema social, o que levaria a colônia à morte. Tal estudo já foi realizado com o uso de feromônio de alarme das seguintes espécies de formigas cortadeiras: *Acromyrmex landolti*, *Atta capiguara*, *Atta sexdens rubropilosa* (ZARBIN & RODRIGUES, 2009).

Outra possibilidade é o uso de compostos atrativos aplicados a iscas que estimulem o carregamento para o ninho.

Estudos recentes têm empregado a incorporação de substâncias tóxicas derivadas de produtos naturais (BIAVATTI *et alii*, 2001; ACÁCIO-BIGLI *et alii*, 2004; GODOY *et alii*, 2005; LEITE *et alii*, 2005 e AMBROZIN *et alii*, 2006). Trabalho que foi iniciado com a observação de que o formigueiro alimentado diariamente com folhas de *Ricinus communis* apresentava uma diminuição de volume do jardim do fungo simbiote (HEBLING *et alii*, 1996). Estes tipos de substâncias podem ser considerados inseticidas naturais. Têm a vantagem de apresentarem ação sobre os microrganismos que vivem em simbiose com as formigas (VICTOR *et alii*, 2001).

O controle biológico também merece destaque. Este emprega os inimigos naturais das formigas, como fungos entomopatogênicos no controle de formigas cortadeiras (ALVES & SOZA, 1983; SILVA & DIEHL-FLEIG, 1988; JACCOUD *et alli*, 1999 e HUGHES *et alli*, 2004). Estudos em laboratório demonstram a eficiência deste método. A porcentagem de mortalidade pode ser superior à 80% como o uso de iscas à base de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em espécies de *Acromyrmex* (SILVA *et alli*, 1993 e DIEHL-FLEIG *et alli*, 1992 e 1993) e podem chegar à 100% em *Atta sexdens rubropilosa* (LIMA *et alii*, 1986). Contudo, as respostas observadas no campo no campo não são animadoras. Os resultados não são satisfatórios devido à dificuldade de aplicação e complexidade do comportamento social destes insetos, o que reduz a eficiência dos entomopatógenos (MARINHO *et alii*, 2006). Formigas cortadeiras apresentam comportamentos higiênicos muito eficazes, como o *grooming* (NORTH *et alii*, 1997). Além de secreções glandulares que minimizam a ação de patógenos nas colônias. As principais glândulas envolvidas são a metapleural e mandibular (MENDONÇA *et alii*, 2009). Além disto, o líquido fecal contém enzimas que são depositadas no material vegetal antes de ser inoculado no jardim de fungo (RODRIGUES *et alii*, 2008). Estes mecanismos de defesa dificultam muito a ação de patógenos em ambiente natural.

GLÂNDULAS EXÓCRINAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS

As glândulas exócrinas das formigas são responsáveis pela produção de um grande número de substâncias que na maioria das vezes estão relacionadas com a comunicação (HÖLLDOBLE & WILSON, 1990). Estas substâncias desempenham uma série de funções vitais para o desenvolvimento e manutenção das colônias de insetos sociais. Os feromônios produzidos por estas glândulas estão distribuídos por todas as partes do corpo dos insetos. A localização destas está diretamente ligada à função que desempenham (MEER *et alii*, 1998).

Em trabalho recente, Billen (2009) relata que, no geral, já foram identificadas 75 glândulas em formigas. Estas variam em tamanho, formato e distribuição entre as espécies. Em formigas cortadeiras as principais glândulas são mostradas na Figura 1.3.

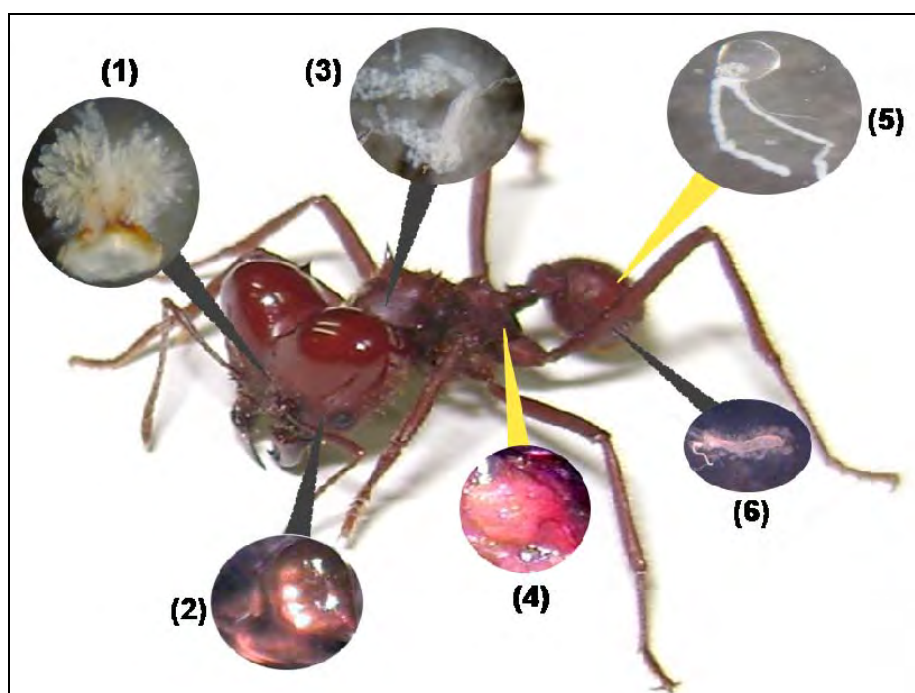


Figura 1.3 – Representação esquemática de glândulas comuns em formigas cortadeiras. Na cabeça estão as glândulas pós-faríngea (1) e mandibular (2); no tórax as glândulas labial (3) e metapleural (4); no abdômen as glândulas de veneno (5) e glândula de Dufour (6).

Neste trabalho o enfoque será dado às glândulas de veneno e metapleural, relacionadas à atividade de forrageamento e manutenção das condições assépticas da colônia de formigas cortadeiras, respectivamente.

A *Glândula Metapleural*, também chamadas de glândulas metaesternais ou metatorácicas, são estruturas complexas localizadas nos cantos posterolaterais do tórax. Cada estrutura consiste de um agrupamento de vesículas em que cada uma se comunica através de um ducto num saco coletor. Este saco coletor é ligado diretamente a um reservatório (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). A secreção desta glândula é formada

principalmente por ácidos carboxílicos, mas também são encontrados fenóis como constituintes da secreção glandular em *Crematogaster deformis* (ATTYGALÉ *et alii*, 1989). São atribuídas muitas funções às substâncias secretadas pela glândula metapleurá, tais como: reconhecimento dos indivíduos do ninho e feromônios de marcação de território (JAFFÉ & PUSCHE, 1984). À esta glândula também são relacionadas as funções de proteção contra microorganismos (RODRIGUES *et alii*, 2008) e atividade antisséptica (ORTIUS-LECHNER *et alii*, 2000).

A *Glândula de Veneno* é constituída por estruturas filamentosas que convergem para uma única glândula, que está ligada a um reservatório de paredes finas (saco de veneno). As Formicinae apresentam o aparato mais evoluído. A função primária desta glândula é a produção de ácido fórmico (em Formicinae) e de veneno usado para predação nas demais formigas (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Nas formigas cortadeiras é nesta glândula que o feromônio de trilha é armazenado. Este é constituído por uma mistura muito específica de substâncias que são utilizadas por estes insetos sociais para orientar outros indivíduos pertencentes à mesma colônia na direção da fonte de alimento, de novos sítios de moradia, no retorno ao ninho, ou para exploração de novas áreas (ATTYGALLE & MORGAN, 1985). Como o feromônio de trilha é constituído de múltiplos compostos, cada espécie produz alguma substância química, em proporções bem definidas, em adição ao odor básico da substância de trilha que atrairá somente os membros da sua própria espécie (MORGAN, 2009).

FORRAGEAMENTO

Formigas cortadeiras apresentam um complexo sistema de forrageamento. Este envolve busca de potenciais áreas de alimentação e recrutamento massal de indivíduos para explorá-las. (JAFFE & HOWSE, 1979). Parte do sucesso destes insetos deve-se ao forrageamento em grupo que é favorecido pelo comportamento eussocial (YDENBERG & SCHMID-HEMPEL,

1994). O modelo de forrageamento usado pelas formigas mostra-se tão eficaz que tem sido aplicado na área de robótica para cobertura de terrenos, por meio da criação da técnica *ant colony optimization* (KOENIG, 2001). A metodologia desta é baseada em inteligência de enxames (*Swarm Intelligence*). Que tem como princípio a tentativa de desenvolver qualquer algoritmo ou dispositivo que se baseie na interação entre indivíduos de um mesmo local, como ocorre em uma colônia de insetos sociais (MENDES, 2004).

O forrageamento em formigas cortadeiras é marcado pelo uso de trilhas químicas que conferem maior eficiência a esta atividade. O início da trilha ocorre após a operária exploradora deixar o ninho para encontrar alimento. Na volta esta marca o caminho com feromônio de trilha. A forma como a operária atrai outros indivíduos para iniciar a exploração da fonte ainda não é bem conhecida. Após esta comunicação outras operárias iniciarão a exploração da fonte guiadas pelo feromônio depositado pela primeira operária. Por ser constituído de substâncias voláteis, este feromônio é constantemente reforçado na trilha (MORGAN, 2009).

Moser e Silverstein (1967) inferiram que o feromônio de trilha de *Atta texana* era composto por, no mínimo, duas frações, uma muito volátil e outra menos volátil. Cinco anos mais tarde Tumlinson *et alii* (1971) identificaram o primeiro composto usado como feromônio de trilha. Este foi o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (**1**). A partir de então, vários trabalhos de elucidação estrutural do feromônio de trilha foram apresentados (RILEY *et alii*, 1974; ROBINSON & CHERRETT, 1978; CROSS *et alii*, 1979; CROSS *et alii*, 1982; EVERSLED & MORGAN, 1983; ATTYGALLE & MORGAN, 1985; NASCIMENTO *et alii*, 1994 e DE OLIVEIRA *et alii*, 1990).

O tamanho do fragmento vegetal carregado pelas operárias pode estar diretamente relacionado ao seu tamanho. Assim operárias maiores maximizam a entrega com fragmentos maiores demonstrando maior eficiência energética (BURD, 2000). No entanto, também observa-se que operárias carregam fragmentos menores que o esperado. Uma vez que se considera a maximização da eficiência individual, estas operárias não estariam

correspondendo ao desempenho esperado. Uma possível explicação para este fato foi apresentada por Burd e Howard (2005). Os pesquisadores mostraram que o forrageamento não termina com a entrega do material na entrada do ninho. O custo energético com o corte do material dentro do ninho, para posterior inoculação do fungo, deve ser considerado no balanço energético total da eficiência do forrageamento. Fragmentos menores são mais rapidamente incorporados pelas mínimas. A Figura 1.4 mostra uma trilha e outras atividades envolvidas no forrageamento.

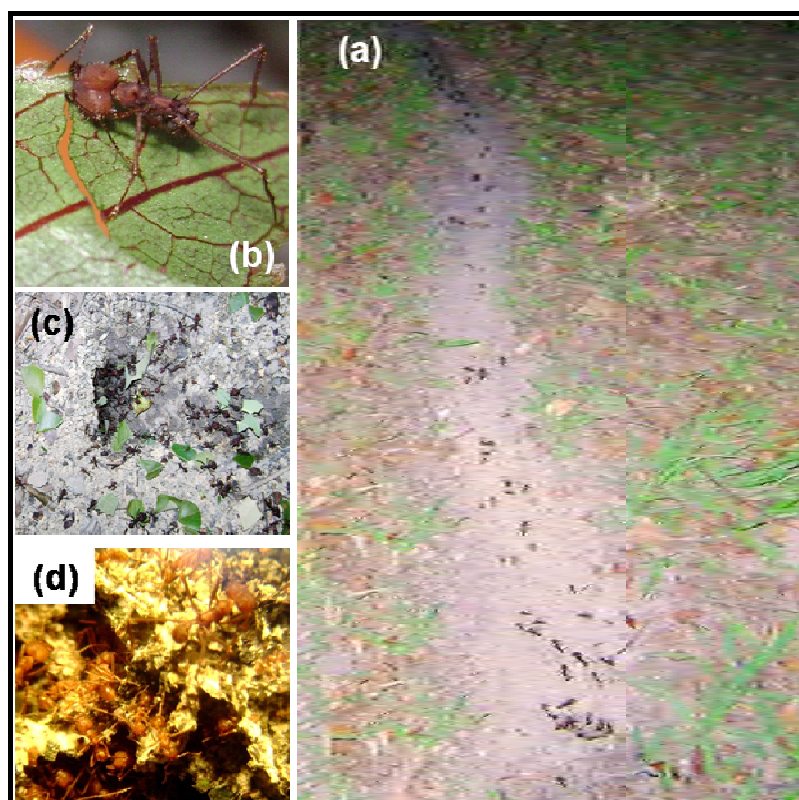


Figura 1.4 - Trilha da formiga cortadeira *A. sexdens rubropilosa* (a); operária realizando corte (b); operárias retornando ao olheiro com os fragmentos vegetais (c), jardim do fungo simbiote (d).

Juntamente com o pirrol **(1)** a 3-etil-2,5-dimetilpirazina **(2)** forma o feromônio de trilha da maior parte das espécies de formigas cortadeiras, sendo a proporção de cada um deles específico de cada espécie (MORGAN, 2006). Estas substâncias são produzidas e estocadas na própria glândula de veneno (TUMLINSON *et alii*, 1971). As estruturas de tais compostos são exibidas na Figura 1.5.

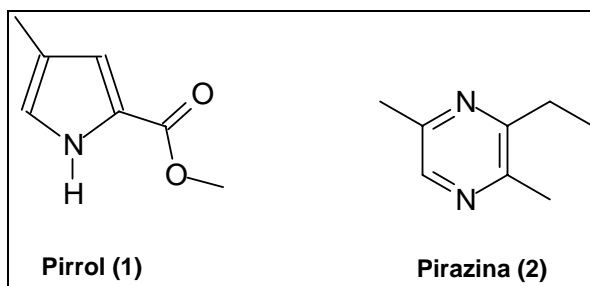
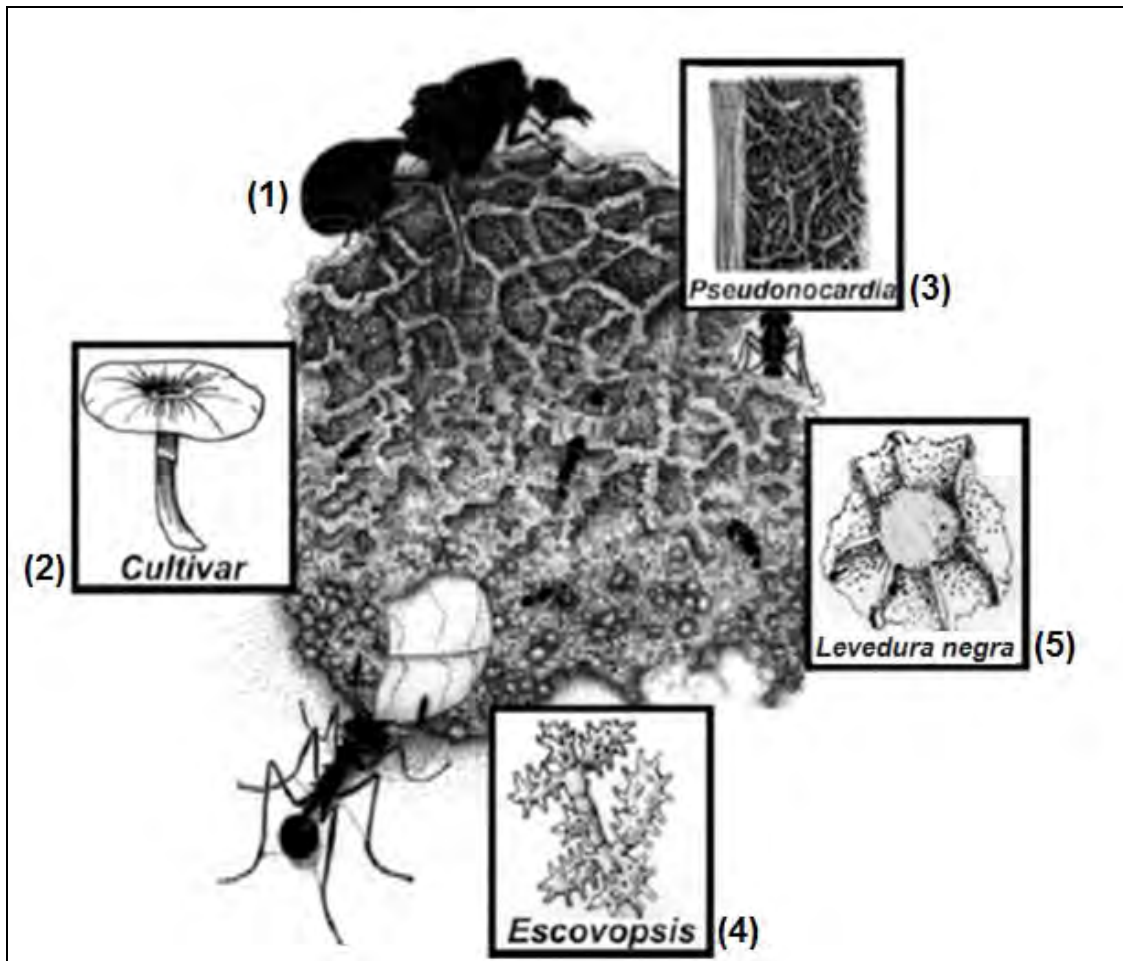


Figura 1.5 - Compostos presentes no feromônio de trilha em formiga cortadeira dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*: 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (1) e 3-etil-2,5-dimetilpirazina (2).

ASSEPSIA NAS COLÔNIAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS

A relação mutualística entre formigas cortadeiras e o fungo simbionte persiste por milhões de anos (CURRIE *et alii*, 2006). As formigas impedem a reprodução sexuada do fungo que não forma corpos de frutificação, já que estes não são usados como alimento. A disseminação da espécie ocorre quando as novas rainhas, fertilizadas, levam micélios deste para fundar uma nova colônia (MUELLER *et alii*, 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 é encontrado apenas as formigas e o fungo simbionte. Na verdade há um sistema complexo, com vários microorganismos envolvidos, incluindo mutualistas (CURRIE *et alii*, 1999a) e parasitas (CURRIE *et alii*, 1999b), Figura 1.6.



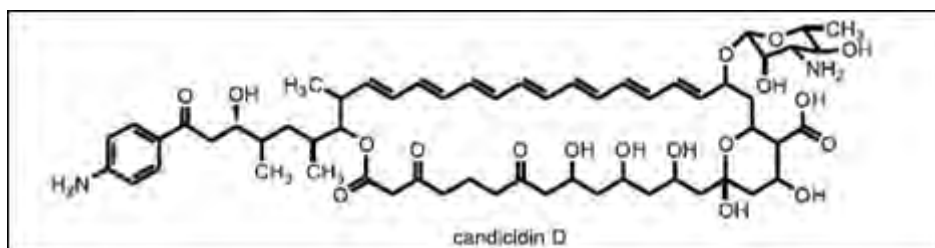
Fonte: CURRIE *et alii*, 2001.

Figura 1.6 - Simbiose existente entre formigas e seus jardins de fungo. Atualmente são caracterizados cinco indivíduos nesta interação: 1) formigas cultivadoras de fungo da tribo Attini; 2) fungo simbiote; 3) bactérias do gênero *Pseudonocardia*; 4) fungo entomopatogênico *Escovopsis*; 5) leveduras negras.

Formigas cortadeiras cultivam somente uma variedade de fungo nas colônias (MUELLER *et alii*, 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 alii*, 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 alii*, 2009).

Em 1972 Weber observou que a cutícula de espécies de *Acromyrmex* eram cobertas por um tipo de “cera”. Foi somente em 1999 que Currie *et alii* descobriram que actinobacterias do gênero *Pseudonocardia* colonizavam a cutícula da formiga *Acromyrmex octospinosus*. Esta bactéria filamentosa produz antibióticos principalmente contra o fungo do gênero *Escovopsis* (CURRIE *et alii*, 1999a). A natureza química do composto responsável pela atividade antifúngica sobre *Escovopsis* foi recentemente revelada (HAEDER *et alii*, 2009). A candicidina D, Figura 1.7, 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.



FONTE: HAEDER *et alii*, 2009

Figura 1.7 – Estrutura do Candicidina D.

Uma revisão publicada em 2009 por Sen *et alii* 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 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.

O quinto elemento da relação simbiote na tribo Attini são leveduras negras, pertencentes ao filo Ascomycota e ao gênero *Phialophora* (LITTLE &

CURRIE, 2007). Alguns gêneros são frequentemente encontrados nos ninhos de formigas cortadeiras (CARREIRO *et alii*, 1997; MIDDELHOVEN *et alii*, 2003; PAGNOCCA *et alii*, 2008 e LITTLE & CURRIE, 2008). O papel das leveduras nos ninhos ainda não é muito claro. Elas podem estar atuando no processo de digestivo gerando compostos, derivados do substrato vegetal, mais assimiláveis por meio de processos enzimáticos (RODRIGUES *et alii*, 2009). Para espécies de *Atta* esta associação seria altamente vantajosa já que bactérias do gênero *Pseudonocardia* são raramente encontradas nos ninhos (CURRIE *et alii*, 1999b e MUELLER *et alii*, 2008). No entanto, a relação com leveduras negras pode ter efeito negativo, pois estas crescem no mesmo local da cutícula onde a bactéria do gênero *Pseudonocardia* está associada. Desta forma, as leveduras poderiam adquirir nutrientes da bactéria e reduzir a habilidade desta de suprimir o parasita *Escovopsis sp.* (LITTLE & CURRIE 2007), Figura 1.8.



FONTE: LITTLE & CURRIE, 2007.

Figura 1.8- 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 alii*, 1989; NASCIMENTO *et alii*, 1996 e HUGHES *et alii*, 2004). Esta defesa

envolve a secreção de compostos com atividade antimicrobiana excretados principalmente pela glândula metapleurá, 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 & ENGEL-SIEGEL, 1984).

A forma com que as formigas usam os antibióticos secretados pela glândula metapleurá 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 alii*, 1997). Outros acreditam que esta abertura seja estimulada frente a uma contaminação (BOT *et alii*, 2002). Fernández-Marín *et alii* (2006) descrevem um comportamento específico para o *grooming* da glândula metapleurá. 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 metapleurá de formigas cortadeiras foram publicados independentemente na década de 70 por Maschwitz *et alii* (1970), e Schildknecht e Koob (1971). As análises químicas das glândulas das espécies *Atta sexdens* e *Atta sexdens rubropilosa* apresentaram os ácidos fenilacético (**3**), β -hidroxiácidos, como o 3-hidroxi-decanóico (**4**) e 3-indolacético (**5**) como principais constituintes. Em 1976, Schildknecht identificou outros dois compostos presentes na secreção da glândula metapleurá de *A. sexdens rubropilosa*, que são os ácidos 3-hidroxi-hexanóico, 3-hidroxi-octanóico. Em 1994 Jaffé relacionou a secreção da glândula metapleurá *Acromyrmex landolti* e *Atta leavigata*, composta principalmente pelo ácido palmítico (**6**), à atividade antimicrobiana.

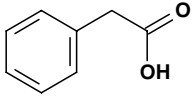
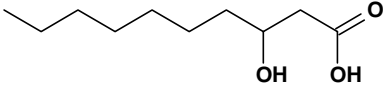
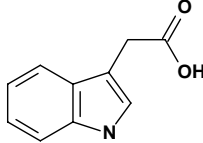
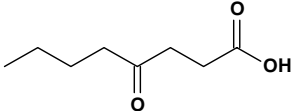
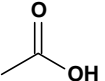
Nascimento *et alii*, (1996) identificou os ácidos fenilacético (**3**), 3-hidroxi-dodecanóico (**4**) e indol acético (**5**) na glândula de *Atta cephalotes* e os ácidos 3-hidroxi-decanóico (**4**) e indol acético (**5**) em *Acromyrmex octospinosus*. Neste mesmo trabalho, os autores confirmam a atividade

antibacteriana e antifúngica dos principais constituintes da glândula metapleurale destas espécies.

Recentemente, Ortius-Lechner et alii (2000) 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, hexanóico, heptanóico; de cadeia longa como ácido tetradecanóico, pentadecanóico e palmítico (**6**); e também cetoácidos como ácido 4-oxooctanóico (**7**) e 4-oxodecanóico. Os autores testaram os ácidos fenilacético, indol acético, hexanóico e octanóico contra os agentes patogênicos humanos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. A maior parte dos compostos apresentou atividade antimicrobiana.

A estrutura química de alguns compostos já identificadas na glândula metapleurale de formigas cortadeiras é mostrada na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 - Estrutura química de compostos identificados na glândula metapleural de formigas cortadeiras que estão relacionados a defesa química contra patógenos.

| Substância secretada | Estrutura | Espécie | Referência |
|--------------------------|--|--|--|
| Ácido fenilacético |  | <i>Atta sexdens</i> <i>Atta sexdens rubropilosa</i> <i>Atta cephalotes</i> | Maschwitz, (1970) Schildknecht & Koob, (1970) Nascimento <i>et alii</i> (1996) |
| Ácido 3-hidrosidecanóico |  | <i>Atta sexdens</i> <i>Atta sexdens rubropilosa</i> <i>Acromyrmex octospinosus</i> <i>Atta cephalotes</i> | Maschwitz, (1970) Schildknecht (1976) Nascimento <i>et alii</i> (1996) Nascimento <i>et alii</i> (1996) |
| Ácido indol acético |  | <i>Atta sexdens</i> <i>Atta sexdens rubropilosa</i> <i>Acromyrmex octospinosus</i> | Maschwitz, (1970) Schildknecht & Koob, (1970) Nascimento <i>et alii</i> (1996) |
| Ácido palmítico | $\text{H}_3\text{C}-[\text{CH}_2]_{13}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ | <i>Acromyrmex landolti</i> <i>Atta leavigata</i> <i>Acromyrmex octospinosus</i> | Jaffé <i>et alii</i> (1994) Jaffé <i>et alii</i> (1994) Ortius-Lechner <i>et alii</i> (2000) |
| Ácido 4-oxooctanóico |  | <i>Acromyrmex octospinosus</i> | Ortius-Lechner <i>et alii</i> (2000) |
| Ácido acético |  | <i>Acromyrmex octospinosus</i> | Ortius-Lechner <i>et alii</i> (2000) |

O tamanho da glândula metapleural é uma importante característica funcional desta glândula. Em um trabalho publicado por Angus *et alii* 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 alii*, 2001, 2002 e DE SOUZA *et alii*, 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 alii*, 2002) e *Aspergillus nomius* (POLSEN *et alii*, 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.

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 & 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 alii*, 2006).

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 & OLDHAM, 1999). A metodologia mais apropriada depende do tipo de material em estudo e disponibilidade de equipamentos adequados (FERREIRA *et alii*, 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 alii*, 1999 e FERREIRA *et alii*, 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 Silicóne (DIOS), Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) e Ionização por *Electrospray* (ESI) (CROTTI, 2006). A ionização por *electrospray* na espectrometria de massas (ESI-MS) é especialmente útil na produção de íons a partir de macromoléculas, pois a propensão destas se fragmentarem quando ionizadas é menor (SIUZDAK, 2005). Pelo desenvolvimento da ionização *electrospray* na análise de macromoléculas biológicas, que tem contribuído para o melhor entendimento dos processos vitais, o norte-americano John Bennett Fenn compartilhou o prêmio Nobel de Química em 2002 com o japonês Koichi Tanaka e o suíço Kurt Wüthrich. Sendo que Wüthrich recebeu a metade do prêmio, pois adaptou à biologia molecular, a ressonância magnética nuclear (RMN) que permite conhecer com maior precisão a mobilidade das moléculas e a sua respectiva visualização tridimensional (COOPER, 2005).

A ionização por *electrospray* é uma técnica que vem se disseminando em diversas áreas da ciência. Esta expandiu o universo de moléculas que podem ser analisadas por espectrometria de massas, incluindo moléculas de alta polaridade, alta complexidade molecular e alta massa. A técnica de ESI é conhecida pela eficiência em transferir íons da fase condensada para a fase gasosa. A particularidade desta técnica é a análise de moléculas polares com massa <2000Da sem a necessidade da realização de uma prévia derivatização, o que ocorre na maioria das outras técnicas analíticas para a análise de compostos não-voláteis, como cromatografia gasosa aliada à espectrometria de massas (VESSECCHI *et al*, 2007).

A técnica de ionização por *electrospray* tem como princípio, transferir íons pré-existentes em uma solução para a fase gasosa, de uma maneira branda e suave. Esta envolve a formação de um spray eletrolítico de uma solução, que gera pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons (MORAES e LAGO, 2002).

É necessária uma fonte de alta tensão (1,0 a 7,0 KV) que esteja em contato com a solução contendo eletrólitos. Esta solução é bombeada através de um microcapilar (d.i. de 50 a 100 μ m) com uma velocidade de fluxo da ordem de 1 a 20

$\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ou menores. Quando um potencial positivo é aplicado na solução, os íons positivos tendem a se afastar para uma região menos positiva, isto é, em direção ao contra-eletrodo. Assim, a gota sendo formada na ponta do capilar estará enriquecida em íons positivos. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra eletrodo aumenta provocando uma deformação na gota que está presa na ponta do capilar. A gota ganha forma de um cone, o qual é denominado cone de Taylor. Esta gota na forma de cone permanece “presa” ao capilar até o momento em que a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vençam a tensão superficial, ocorrendo a liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga. A frequência deste processo depende da magnitude do campo elétrico, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução (MORAES e LAGO, 2002).

Posteriormente a gota sofrerá dessolvatação e a massa do solvente é reduzida por evaporação, com o auxílio de um gás inerte secante. Os íons formados serão conduzidos ao analisador de massas. Existem diversos dispositivos para a separação de íons com diferentes valores de massa-carga. O analisador deve permitir a passagem de um número de íons suficiente para fornecer uma corrente de íons facilmente mensurável.

Neste trabalho será considerado apenas o analisador de massa do tipo tempo-de-vôo (TOF). Este tem como princípio básico de operação a medida do tempo que um íon leva para viajar da fonte de íons até o detector. Na aceleração os íons recebem o mesmo acréscimo de energia cinética. Pela diferença na relação m/z que cada íon possui ocorre a separação, pois esta é dependente da velocidade atravessam a região livre de campo a fonte de íons e o detector (WATSON & SPARKMAN, 2007).

REFERÊNCIAS

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 Management Science** , v. 60, p. 933-938, 2004.

ALVES, S.B.; SOZA GOMES, D. Virulência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). **Poliagro**, v. 5, n.1, p.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. e BACCI JR., M. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 542 - 547, 2006.

ANGUSM, C. J.; JONES, K. e BEATTIE, A. J. A possible explanation for size differences in the metapleural glands of ants (hymenoptera: formicidae). **Journal of the Australian Entomological Society**, v.32, p.13-11, 1993.

ATTYGALLE, A. B. e MORGAN, E. D. Ant Trail Pheromones. **Advances in Insect Physiology**, v. 18, p. 1-30, 1985.

ATTYGALLE, A. B.; SIEGEL, B.; VOSTROWSKY, O.; BESTMANN e H. J.; MASCHWITZ, U. Chemical composition and function of metapleural gland secretion of the ant, *Crematogaster deformis* smith (hymenoptera: Myrmicinae). **Journal of Chemical Ecology**, v.15, p. 317, 1989.

BACCI Jr, M. Limonoids from *Cipadessa fruticosa* and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1391-1395, 2005.

BENTO, J. M. Fundamentos do monitoramento, da coleta massal e do confundimento de insetos-praga. *In*: VILELA, E. F. e DELLA LUCIA, T. M. C. (Eds.). **Feromônios de Insetos**; Biologia, Química e emprego no manejo de pragas. 2ª Ed. Viçosa: UFV - Imprensa Universitária, 2001, p. 135 - 144.

BERTI FILHO, E.; MARCHINI, L.C e NAKANO, O. **Curso de entomologia aplicada à agricultura**. IN: *Formigas cortadeiras e cupins*. Piracicaba, FEALQ. 1992, p. 631-671.

BIAVATTI, M.W.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; ALBUQUERQUE, S; MAGALHÃES, S.C.M.I. e PAGNOCCA, F.C. Chemistry and bioactivity of *Raulinoa echinata* Cowan, an endemic Brazilian Rutaceae species. **Phytomedicine** , v.8, p. 121-124, 2001.

BILLEN, J. Occurrence and structural organization of the exocrine glands in the legs of ants. **Arthropod Structure & Development**, v.38, p. 2–15, 2009.

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

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

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

BURD, M. Body size effects on velocity and load carriage in the highly polymorphic leaf-cutting ants *Atta colombica* and *Atta cephalotes*. **Behavioral Ecology**, v. 11, p. 125–131, 2000.

BURD, M. A. e HOWARD, J. J. Central-place foraging continues beyond the nest entrance: the underground performance of leaf-cutting ants. **Animal Behaviour**, v. 70, p. 737–744, 2005.

BUTLER , C. G. The method and importance to the recognition by a colony of honeybee (*Apis mellifera*) of the presence of its queen. **Transactions of the Royal Entomological Society of London**, 1954, v. 105, p. 11-29 *apud* MOTA, M. H. V. B; CRUZ-LANDIM, C. Ocorrência e morfometria de glândulas tegumentares Abdominais em *apis mellifera* L. (Hymenoptera, apidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 5, n. 1, p. 119-154, 1988.

CHERRET, J. M. **History of the leaf-cutting ant problem.** In LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Ed.). **Fire ants e leaf-cutting ants: biology and management.** Boulder: Westview Press, 1986. p. 10-17 *apud* HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. *The Ants*, Cambridge: Belknap, 1990.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L. E BONATO, P. S. (Eds.), **Introdução A Métodos Cromatográficos.** 7ª ed., Campinas, SP. Editora da UNICAMP, 1997, p13.

CROSS, J. H.; BYLER, R C.; RAVID, U.; SILVERSTEIN, R. M.; ROBINSON, S. W.; BAKER, P. M.; JUTSUM, A. R.; CHERRETT, J. M. e DE OLIVEIRA, J. S. The major component of the trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa* Forel: 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine, **Journal of Chemical Ecology**, v.5, p.187-203, 1979.

CROSS, J. H.; WEST, J. R.; SILVERSTEIN, R. M.; JUTSUM, A. R. e CHERRETT, J. M. Trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Acromyrmex octospinosus* (Reich), (Formicidae: Myrmicinae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 8, p. 1119-1124, 1982.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R; LOPES, N. P; LOPES, L. C. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

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

CURRIE, C. R; MUELLER ,U. G. e MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, v. 96, p.7998–8002, 1999b.

CURRIE, C. R. A COMMUNITY OF ANTS, FUNGI, AND BACTERIA: A Multilateral Approach to Studying Symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 357–80, 2001.

CURRIE, C. R. e STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the Royal Society**, v. 268, p.1033–1039, 2001.

CURRIE, C. R.; POULSEN, M.; MENDENHALL, J.; BOOMSMA, J. J. e BILLEN, J. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. **Science**, v.311, p.81–83, 2006.

DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F.; MOREIRA, D. D. O. Feromônios de formigas pragas. *In*: VILELA, E. F. e DELLA LUCIA, T. M. C (Eds.). **Feromônios de Insetos; Biologia, Química e emprego no manejo de pragas**. 2ª Ed. Viçosa: UFV - Imprensa Universitária, 2001, p. 73 - 82.

DE OLIVEIRA, J. S.; MARTINEZ, O. M. M.; CARNIERI, N.; VILELA, E. F. e REIS, H. O. Components of the trail pheromone of the leaf-cutting ants *Atta laevigata* F. Smith and *Atta bisphaerica* Forel (Formicidae: Attini). **Annals of the Entomological Society**, v. 19, p.145-154, 1990.

DE SOUZA, A. L. B.; SOARES, I. M. F.; CYRINO, L. T. e SERRÃO, J. E. The metapleural gland in two subspecies of *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae), **Sociobiology**, v. 47, p.19–25, 2006.

DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **As formigas cortadeiras**. Ed. Folha da Mata, p.43-53, 1993.

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E.; SPECHT, A. e BORTOLÁS, E. P. Emprego do fungo entomopatogênico *Beauveria hassiana* em iscas para o controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex* spp. em floresta implantada de *Eucalyptus grandis*. *In*: **Anais do 7º Congresso Florestal Estadual**. Nova Prata, RS, Brasil, p 1139-1150.

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E.; SPECHT, A. e VALIM-LABRES, M. E. Efficiency of *Beauveria hassiana* for *Acromyrmex* spp. Control (Hymenoptera: Formicidae). **Anais Sociedade Entomologia Brasil**, p. 281-285, 1993.

ERTHAL JUNIOR, M.; SILVA, C.P. e SAMUELS, R. I. Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. **Journal of Insect Physiology**, v.50, p.881-891, 2007.

EVERSHED, R. P. e MORGAN, E. D. The amounts of trail pheromone substances in the venom of workers of four species of attine ants. **Insect Biochemistry**, v. 13, p. 469-474, 1983.

FARJI-BRENNER, A. G. F. e RUGGIERO, A. Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhabiting Argentina: patters in species richness and geographical range sizes. **Journal of the Biogeography**, v. 21, p. 391-399, 1994.

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

FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; REHNER, S. A. e WCISLO, W.T. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection, **Proceedings of the Royal Society**, v. 273, p. 1689–1695, 2006.

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

FISHER, P.J .; STRADLING, D. J. e PEGLER, D. N. Leaf-cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*. **Mycologist**, 8: 128-132, 1994.

FOWLER, H. G.; PEREIRA-DA-SILVA, V.; FORTI, L. C. e SAES, N. B. **Population Dynamics of Leaf-Cutting Ants: A Brief Review** In LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Ed.). **Fire ants e leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder: Westview Press, p. 123-146, 1986.

GODOY, M.F.P.; VICTOR, S.R.; BELLINI, A.N.; GUERREIRO, G., ROCHA, W.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; BACCI, M.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B. e PAGNOCCA, F.C. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 669-672, 2005.

GORDON, D. M. The Organization of Work in Social Insects Colonies. **Nature**, v. 380, p.121-124, 1996.

HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H. e SPITELLER, D. Candicidin producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 12, p. 4742-6, 2009.

HAINES, B. L. Element and energy flows through colonies of the leaf-cutting ant, *Atta-colombica*, in Panama. **Biotropica**, 10: 270-277, 1978.

HEBLING, M. J. A.; MAROTI, O. S.; BUENO, O. C.; SILVA, A. O. e PAGNNOCCA, F. C. **Bulletin of Entomological Research**, v. 86, p. 253, 1996.

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. **Anais da Sociedade Entomologia Brasileira**, v. 24, p. 287-298, 1995.

HOLLDÖBLER, B. & ENGEL-SIEGEL, H. On the metapleural gland of ants. **Pysche**, v. 91, p. 201-224, 1984.

HÖLLDÖBLER, B. & WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990.

HUGHES, W. O. H., HOWSE, P. E. e AGOULSON, D. Mandibular gland chemistry of grass-cutting ants: species, caste, and colony variation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, p. 109-124, 2001.

HUGHES, W. O. H.; THOMSEN, L.; EILENBERG, J. e BOOMSMA, J. J. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, p.46-53, 2004.

JACCOUD, D. B.; HUGHES, W. O. H.; JACKSON, C. W. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 93, p. 51–61, 1999.

JAFFE, K. e HOWSE, P. E. The mass recruitment system of the leaf cutting ant, *Atta cephalotes* (L.). **Animal Behaviour**, v. 27, p. 930–939, 1979.

JAFFE, K., VASQUEZ, C., BRANDWIJK, L. e CABRERA, A. **Metapleural gland secretions in ants**. In: LENOIR, A., ARNOLD, G., LEPAGE, M. (Eds.). *Les Insectes sociaux*. Paris: Université Paris Nord, p. 217, 1994.

JAFFÉ, K. e PUSHE, H. Colony-specific territorial marking with the metapleural gland secretion in the ant *Solenopsis geminata* (Fabr). **Journal Insect Physiology**, v.30, p.265, 1984.

JONES, G. R. & OLDHAM, N.L J. Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 843, p. 199–236, 1999.

KOENIG, S.; SZYMANSKI, B. e LIU, Y. Efficient and Inefficient Ant Coverage Methods. **Annals of Mathematics and Artificial Intelligence**, v. 31, 2001.

LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; OLIVEIRA, C. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C; HEBLING, M. J. A. e LIMA, A. F.; VIEGAS, E. C.; RACCA, F. F., *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin no controle de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). In: **Resumos de X Congresso Brasileiro de Entomologia**, Brasil, pp. 196. 1986.

LITTLE, A. E. F. e CURRIE, C. R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungusgrowing ants. **Ecology**, v.89, p.1216–1222, 2008.

LITTLE, A. E. F. e CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant–microbe symbiosis. **Biology Letters**, v.3, p.501–504, 2007.

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

MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; PICANÇO, M. C. Fatores que dificultam o controle de formigas cortadeiras. **Bahia Agrícola**, v.7, n.2, 2006.

MASCHWITZ, U.; KOOB, K. e SCHILDKNECHT, H. Ein Beitrag zur Funktion der Metathorakaldr use der Ameisen. **Journal of Insect Physiology**, v. 16, p. 387–404, 1970.

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

MEER, V.; BREED, M.; WINSTON, M. e ESPELIE, K. E. **Pheromone Communication in Social Insects**. Boulder, Westview Press, p. 1-8, 1998.

MENDES, R. Population Topologies and Their Influence in Particle Swarm Performance. 2004. 171 p. Tese de Doutorado - Departamento de Informática Escola de Engenharia Universidade do Minho, Portugal. Abril de 2004.

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

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

MORAES, M. C. B.; BRITO, J. G. A.; LAGO, C. L. J. Boron isotopic ratio by electrospray mass spectra of tetrafluoroborate Part 1. Instrumental conditions, data acquisition, memory effect, and ion stability. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 16, p.1259, 2001.

MORGAN, E. D. Trail pheromones of ants. **Physiological Entomology**, v. 34, p. 1-17, 2009.

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

MOSER, J.C. e SILVERSTEIN, R. M. **Volatility of trail marking substance of the town ant**. **Nature**, v. 215, p. 206-207, 1967.

MUELLER, U. G.; GERARDO, N.M.; AANEN, D. K.; SIX, D. L. e SCHULTZ ,T. R. The evolution of agriculture in insects. **Annual Review Ecological. Evolution System**, v. 36, p.563–95, 2005.

MUELLER, U. G.; DASH, D.; RABELING, C. e RODRIGUES, A. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. **International Journal of Organic Evolution**, v.62, p.2894–2912, 2008.

NASCIMENTO, R. R., MORGAN, E. D., MOREIRA, D. D. O. e DELLA LUCIA, T. M. C. Trail pheromone of leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Forel). , **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, p. 1719-1724, 1994.

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

NORDLUND, D. A. e LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, p. 211-220, 1976.

NORTH, R. D., JACKSON, C. W. e HOWSE, P. E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leafcutting ants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, p. 386–389, 1997.

ORTIUS-LECHNER D.; MAILE, R.; MORGAN, E. D. e BOOMSMA, J. J. Metapleural gland secretion of the leaf-cutter ant *Acromyrmex octospinosus*: new compounds and their functional significance, **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 7, p. 1667-1683, 2000.

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

POULSEN, M.; HUGHES, W. O. H. e BOOMSMA, J. J. Differential resistance and the importance of antibiotic production in *Acromyrmex echinatio* leaf-cutting ant castes towards the entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius*. **Insects Sociaux**, v. 53, p. 349–355, 2006.

RIBEIRO, R. Produtos orgânicos persistentes (POP's). São Paulo, 2009. Disponível em: <http://paginas.fe.up.pt/~jotace/legislacao/convestocolmo_ing.PDF>. Acesso em dezembro de 2009.

RILEY, R.G., SILVERSTEIN, R.M., CARROLL, B. e CARROLL, R. Methyl 4-methylpyrrole-2-carboxylate: a volatile trail pheromone from the leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. **Journal of Insect Physiology**, v. 20, p. 651-654, 1974.

ROBINSON, S.W. e CHERRETT, J.M. The possible use of methyl 4-methylpyrrole-2-carboxylate, an ant trail pheromone, as a component of an improved bait for leaf-cutting ant (Hymenoptera:Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 68, p.159-170, 1978.

RODIONOVA, N.A. e BEZBORODOV, A.M. Localization of enzyme systems that degrade cell wall polysaccharides in higher plants: pectinases (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 33, p. 415-432, 1997.

RODRIGUES, A.; CARLETTI, C. D.; BUENO, O. C. e PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 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 microfungi garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p.331-342, 2009.

SAKAI, S. A review of brood-site pollination mutualism: plants providing breeding sites for their pollinators. **Journal of Plant Research**, v. 115, n. 3, p. 161-168, 2002.

SCHILDKNECHT, H. e KOOB, U. Plant bioregulators in the metathoracic glands of myrmicine ants. **Angewandte Chemie International**, v. 9, p. 173, 1971.

SCHILDKNECHT, H. Chemical ecology – a chapter of modern natural products chemistry. **Angewandte Chemie International**, v. 15, p. 214-22, 1976.

SCHULTZ, T. R. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. *In search of ant ancestors*, v. 97, p. 14028-14029, 2000.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 42, p. 17805-17810, 2009.

SHOREY, H. H. Behavioral responses to insect pheromones. **Annals Review of Entomology**, v.18, p.349-380, 1973.

SILVA, G.E.; MACHADO, V.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E. e SPECHT, A. Potencial de *Beauveria hassiana* como agente de controle das formigas cortadeiras em áreas de reñorestamento. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 15, p. 87-94, 1993.

SILVA, M.E. e DIEHL-FLEIG, E. Avaliação de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos para controle da formiga *Atta sexdens piriventris* (Santschi,

1919) (Hymenoptera: Formicidae). **Anais Sociedade Entomologia Brasil**, v. 17, p. 263-269, 1988.

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

SIUZDAK, G. **An Introduction to Mass Spectrometry Ionization: An excerpt from The expanding role of mass spectrometry em Biotecnologia**. 2.ed.; MCC Press, 2005.

SOUTO, L.S.; SCHAEFER, C.E.G.R. SCHOEREDER, J.H.; LIMA, E. Sequestro de carbono por saúvas e sua possível influencia na diminuição do efeito estufa. *In* VILELA, E.F.; SANTOS, I.A.; SCHOEREDER, J.H.; SERRÃO, J.E.; CAMPO, L.A.O.; LINO-NETO, J. **Insetos sociais da Biologia à aplicação**. Viçosa, MG, Ed. UFV, 2008, 442p.

TAGUCHI, S.; BULET, P.; HOFFMANN, J. A. A novel insect defensin from the ant *Formica rufa*. **Biochimie**, v. 80, n. 4, p. 343-346, 1998.

THOMAS, J. C. **Formigas cortadeiras; instruções básicas para o controle**. EMATER-PR (Dossiê Técnico),p. 1-26, 1990.

TUMLINSON, J. H.; SILVERSTEIN, R. M.; MOSER, J. C.; BROWNLEE R. G. e RUTH, J. M. Identification of the Trail Pheromone of a Leaf-cutting Ant, *Atta texana*. **Nature**, v. 234, p. 348-349, 1971.

VESSECCHI, R.; CROTTI, A.E.M.; GUARATINI, T.; COLEPICOLO, P.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P. Radical Ion Generation Processes of Organic Compounds in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v.4, p 75-87, 2007.

VICKERS, N. J.; CHRISTENSEN, T. A.; MUSTAPARTA, H.; BAKER, T. C. Chemical communication in heliothine moths. III. Flight behavior of male *Heliocoverpa zea* and *Heliothis virescens* in response to varying ratios of intra- and interspecific sex pheromone components. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 169, p. 275–280, 1991.

VICTOR, S. R.; CRISÓSTOMOS, F. R.; BUENO, F. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; CORREA, A. G.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; VILELA, E. F. e DELLA LUCIA, T. M. C. Introdução aos semioquímicos e terminologia. *In*:

Feromônios de Insetos; Biologia, Química e emprego no manejo de pragas. 2ª Ed. Viçosa: UFV - Imprensa Universitária, 2001, p. 9 - 12.

WATSON, J. T. & SPARKMAN, O. D. **Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation.** 4a Ed., John Wiley & Sons, 2007, p. 53-66.

WEBER, N. A. **Gardening Ants: the Attines.** Philadelphia, American Philosophical Society, 1972.

WILSON, E. O. Causes of ecological success: the case of the ants. **Journal of Animal Ecology**, v. 56, p.1-9,1987.

YDENBERG, R. e SCHMID-HEMPEL, P. **Modelling social insect foraging.** Tree , v. 9, p. 49-50,1994.

ZANETTI, R.; CARVALHO, G. A.; SANTOS, A.; SOUZASILVA, A. e GODOY, M. S. **Manejo integrado de formigas cortadeiras.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002.

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, J. T. B.; LEAL, W. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química nova**, v. 22, n. 2, 1999.

ZARBIN, P. H. G. e RODRIGUES, M. A. C. M. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722-731, 2009.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE HERBICIDA DOS CONSTITUINTES DO FERÔMONIO DE TRILHA DE *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

INTRODUÇÃO

A atividade forrageira das formigas cortadeiras é caracterizada pela presença de grandes trilhas que ligam o ninho à fonte de substrato alimentar. Estas podem ter até 300m de extensão (LEWIS *et alii*, 1974 e HOWARD, 2001), e tem como característica o fato de permanecerem livres de vegetação ou qualquer empecilho que dificulte o forrageamento. Desta forma a eficiência no transporte de fragmentos vegetais para o ninho é beneficiada (KOST *et alii*, 2005).

Formigas cortadeiras usam o feromônio de trilha para marcar quimicamente o caminho, que será seguido por outros indivíduos da colônia, até a fonte de alimento. Segundo Jaffé e Howse (1979), apenas uma operária pode ser responsável pelo recrutamento de um grande número de operárias para o forrageamento. Estes autores relacionaram as principais características para o recrutamento em massa de formigas cortadeiras dos gêneros de *Atta* e *Acromyrmex*. Estes constataram que o recrutamento é induzido e regulado unicamente por sinais químicos, que é o feromônio de trilha estocado na glândula de veneno (GV). A concentração do feromônio na trilha tem influência direta sobre o número de operárias que darão início a atividade de forrageamento. O feromônio de trilha orienta as formigas até a fonte de alimento assim como no retorno para o ninho. Por ser constituído de uma mistura de compostos voláteis, há necessidade de ser constantemente reforçado sobre a trilha.

O primeiro feromônio de trilha identificado foi o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (pirrol **1**) em *Atta texana* (TUMLINSON *et alii*, 1971). Entre as décadas de 70 e 80 várias outras *attines* tiveram os constituintes feromonais identificados, *Atta cephalotes* (RILEY *et alii*, 1974); *Acromyrmex octospinosus* (ROBINSON & CHERRETT, 1978 e EVERSLED & MORGAN, 1983); *Atta sexdens rubropilosa* (CROSS *et alii*, 1979); *Acromyrmex octospinosus* (CROSS *et alii*, 1982) e *Atta sexdens sexdens* (EVERSLED & MORGAN, 1983).

O pirrol (**1**) juntamente com a 3-etil-2,5-dimetilpirazina (pirazina **2**), são os principais compostos que formam o feromônio de trilha de grande parte das espécies de formigas cortadeiras. A proporção destes varia de acordo com as

espécies, desta forma cada colônia pode ter um feromônio de trilha específico (MORGAN, 2009).

A única análise quantitativa da glândula de veneno de *Atta sexdens rubropilosa* foi feita por Evershed e Morgan em 1983. Os autores procederam a extração das glândulas em solvente e estimaram que cada operária com cápsula cefálica entre 3,0 – 3,5 mm continha cerca de 5,0 ng dos principais constituintes, pirrol (1) e pirazina (2). Além destes há outros compostos em concentrações mais baixas, como o etanal e outros compostos oxigenados. Neste mesmo trabalho os autores analisaram os constituintes da GV para outras três espécies de formigas cortadeiras: *Atta cephalotes*, *Acromyrmex octospinosus*, *Atta sexdens sexdens*. Recentemente Morgan *et alii* (2006), realizaram um estudo sobre a composição do feromônio de trilha em diferentes castas de uma sub-espécie de *Atta sexdens*, a *A. sexdens sexdens*. Mostrando que a proporção da pirazina (2) está positivamente relacionada com o tamanho do indivíduo, e pode chegar a 35 ng. Sendo que ainda estão presentes outros compostos em menor proporção. No trabalho desenvolvido por Evershed e Morgan em 1983 foi estimado cerca de 4,3 ng da pirazina (2), para *A. sexdens sexdens*. A diferença entre os dois trabalhos está na técnica de extração utilizada. Enquanto que em 1983 a extração das glândulas foi feita em solvente orgânico, em 2006 as glândulas foram postas em capilares e analisadas diretamente no cromatógrafo gasoso (MORGAN, 1990). Assim foi possível evitar diluições e até a contaminação proveniente do uso do solvente, obtendo-se análises quantitativas com maior sensibilidade. A trilha de forrageamento permanece livre de vegetação por longos períodos, e os custos de constante manutenção das trilhas são altos para a colônia (HOWARD, 2001). Logo, imaginando uma estratégia evolutiva baseada na redução do custo energético, é plausível pensar que o feromônio de trilha ou algum constituinte da glândula de veneno tivesse ação herbicida. Neste feromônio estão presentes principalmente compostos nitrogenados heterocíclicos, e é sabido que alguns destes compostos têm grandes aplicações como herbicidas comerciais (HIGASHIO & SHOJI, 2005).

A hipótese levantada é corroborada pela semelhança estrutural dos constituintes do feromônio de trilha a compostos relacionados com atividade herbicida. Em 2002, Schweitzer *et alii* apontaram alguns compostos heterocíclicos

pirrólicos como inibidores da enzima imidazol-glicerol-fosfato-desidratase (IGPD), que é essencial no caminho biossintético da histidina, um aminoácido de grande importância no desenvolvimento de plantas. Como pode ser observado na Figura 2.1, os inibidores da enzima IGPD apresentam semelhança estrutural com o pirrol (1). A busca de compostos que atuem especificamente na inibição de aminoácidos vem sendo o alvo de muitas pesquisas, em função do interesse de companhias agroquímicas. Esta classe de compostos tem ação específica sendo menos agressiva ao ambiente (DANCER *et alii*, 1996 e AMARO *et alii*, 2005).

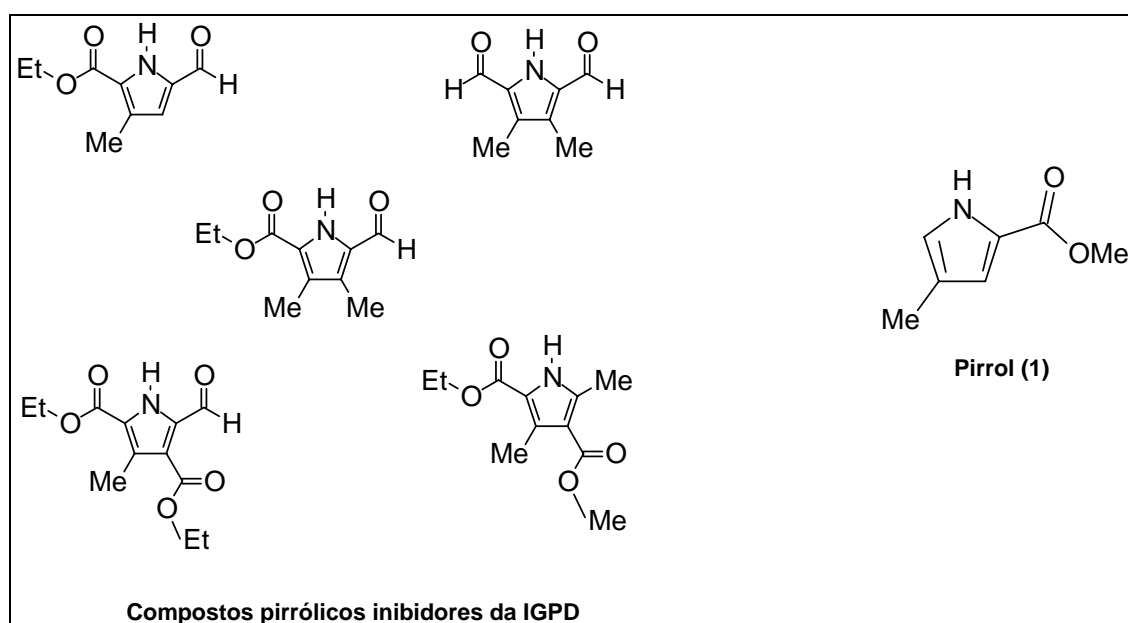


Figura 2.1 – Estrutura dos compostos pirrólicos inibidores da imidazol-glicerol-fosfato-desidratase (IGPD) e do composto presente no feromônio de trilha de formigas cortadeiras.

Também há relatos na literatura de compostos com atividade herbicida estruturalmente semelhantes à 3-etil-2,5-dimetilpirazina. Estes trabalhos abordam inibidores fotossintéticos e são desenvolvidos principalmente pelo grupo do químico Martin Dolezal. A estrutura básica dos compostos derivados de pirazinas trissubstituídas nas posições 2, 3 e 5, testados pelo grupo de Dolezal é mostrada na Figura 2.2. Na maioria dos bioensaios a inibição fotossintética dos diferentes compostos foi avaliada sobre o espinafre. Os compostos são produtos das reações com alterações nos radicais (R_1 , R_2 e R_3), (DOLEZAL *et alii*, 1996; 1999; 2000; 2006; 2007; 2008 e 2009) .

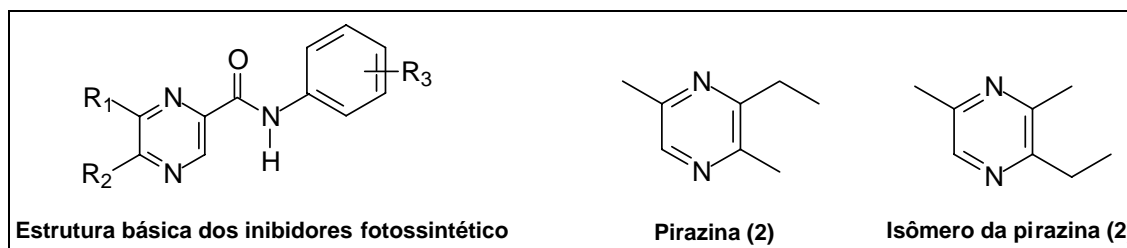


Figura 2.2 - Estrutura básica do inibidor fotossintético derivado de pirazina e estruturas das pirazinas presentes no feromônio de trilha.

O uso de um herbicida natural usado por formigas foi descrito por Frederickson *et alii* em 2006. Neste estudo, os pesquisadores evidenciaram um aspecto muito interessante da relação mutualística entre a formiga *Myrmelachista schumanni* (Formicinae) e plantas da espécie *Duroia hirsuta* (Rubiaceae). A formiga *M. schumanni* é arborícola e faz seus ninhos nos troncos *D. hirsuta*. A fim de preservar o nicho onde vivem, as formigas impedem o crescimento de qualquer outra vegetação nas mediações de seus ninhos. Desta forma elas mantêm jardins de uma única espécie de árvore em várias regiões na diversificada flora Amazônica. A inibição do crescimento da vegetação invasora é feita pelo ataque das operárias de *M. schumanni*. Estas injetam ácido fórmico, principal composto identificado na glândula de veneno, ocasionando a necrose e morte de qualquer planta diferente de *D. hirsuta*, Figura 2.3.

Este fenômeno é denominado pelas comunidades nativas locais como “Jardins do demônio” (*Devil’s gardens*). Segundo a lenda local estas áreas, no meio da floresta, onde somente uma espécie de árvore estava presente era cultivada por espíritos malignos.



FONTE: FREDERICKSON *et alii*, 2006

Figura 2.3 - *Devil's gardens* estabelecidos por *Myrmelachista schumanni* pela inibição do crescimento de qualquer planta diferente de *Duroia Hirsuta*, na qual fazem ninhos. **(a)** Um exemplo de *Devil's garden*, onde é possível observar a monocultura de árvores de *Duroia Hirsuta* que apresentam menor porte, em contrastes com a diversificada floresta tropical ao fundo; **(b)** Operária de *Myrmelachista schumanni* atacando uma planta invasora, primeiramente a formiga faz um pequeno corte no tecido vegetal, e então insere a ponta do abdômen no corte para injetar o ácido fórmico; **(c)** Com a ação do herbicida as folhas desenvolvem necroses que ocasionam a morte da planta.

Neste contexto, foi averiguada a possibilidade de algum composto presente no feromônio de trilha possuir uma dupla função, atuando também como herbicida. Os constituintes feromonais são altamente voláteis, o que facilita o seguimento de trilha já que as formigas se guiam pela nuvem de odor formada pela difusão do feromônio no ar (MORGAN, 2009). Tal fato ainda sugere a presença de compostos menos voláteis na glândula de veneno, que poderiam possuir ação herbicida. Estes compostos poderiam ser proveniente do metabolismo das formigas como a oxidação de constituintes feromonais. Estes compostos seriam depositados juntamente com o feromônio de trilha, mas com a função de inibir o crescimento de vegetação não desejada nesta. A dificuldade encontrada na identificação destas

substâncias até o momento é justificada pelo fato de não serem voláteis nas condições usadas normalmente para análise. Uma vez que os métodos tradicionais de análise deste tipo de metabólitos utilizam a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), a volatilidade é primordial na caracterização por esta técnica analítica. Para a análise de ácidos por CG-EM é necessário antes realizar uma reação de derivatização, desta forma o ácido é convertido no derivado éster volátil (JONES & OLDHAM, 1999).

Assim, o objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito herbicida do extrato da glândula de veneno (EGV) de *Atta sexdens rubropilosa* sobre sementes pré-germinadas de alface, *Lactuca sativa*. Como o principal composto presente no feromônio de trilha de *Atta sexdens rubropilosa* é a 3-etil-2,5-dimetilpirazina (CROSS *et alii*, 1979), no bioensaio de inibição testou-se também o ácido pirazino-2-carboxílico (ácido **8**), um derivado menos volátil da pirazina presente no feromônio, Figura 2.4.

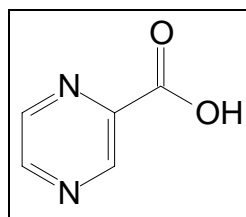


Figura 2.4 – Estrutura do ácido pirazino-2-carboxílico (**8**).

MATERIAL E MÉTODOS

- *Formigas*

O bioensaio foi conduzido com formigas da espécie *Atta sexdens rubropilosa* de ninho do campo. O ninho estava localizado no Clube de Regatas Saldanha da Gama, Avenida Alberto Lamego, nº170, bairro Horto, Campos os Goytacazes – RJ (21,7636° S e 41,2826° W). A coleta das operárias foi realizada entres os meses de janeiro e março de 2009. Para a extração das glândulas foram selecionadas formigas que estavam na trilha de forrageamento e carregavam fragmentos vegetais.

- *Obtenção dos extratos*

Extratos de glândula de veneno foram elaborados a partir de operárias médias com cápsulas cefálicas de 3,6 mm a 4,3 mm de largura. Tendo como base os trabalhos publicados por Evershed e Morgan (1983) e Morgan *et alii* (2006), foram elaborados quatro extratos, com o número de glândulas e concentrações estimadas mostradas na Tabela 2.1. As glândulas extraídas, para os quatro extratos, foram depositadas em 100µL de metanol.

Tabela 2.1 – Número de glândulas de veneno e as respectivas concentrações estimadas para cada extrato preparado.

| Extrato | Número de glândulas | Concentração estimada |
|---------|---------------------|-----------------------|
| 1 | 2000 glândulas | 0,1 mg/mL |
| 2 | 200 glândulas | 0,01 mg/mL |
| 3 | 20 glândulas | 0,001 mg/mL |
| 4 | 2 glândulas | 0,0001 mg/mL |

- Montagem do bioensaio

O bioensaio para a avaliação da atividade herbicida do feromônio de trilha, constituiu da aplicação dos tratamentos sobre sementes pré-germinadas de alface, como esquematizado na Figura 2.5. No bioensaio adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos e quatro parcelas, que foram as diferentes concentrações dos tratamentos.

O ensaio foi realizado em placas Petri de 15 cm de diâmetro forradas com duas folhas de papel filtro. Inicialmente cada placa contendo papel filtro foi umedecida com 4mL de água destilada e nela foram dispostas 80 sementes. O procedimento foi o mesmo para as quinze placas, totalizando 1200 semente. As sementes foram pré-germinadas à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16/8h C/E por 72 h. Após este período os tratamentos foram preparados. Cada tratamento constituiu de uma placa com duas folhas de papel filtro umedecido com 3mL de solução veículo e 35 sementes pré-germinadas. As sementes foram separadas com base no comprimento radicular. Os quatro tratamentos: Pirazina (**1**), o Alaclor (**9**), e o Ácido (**8**) foram aplicados nas concentrações de 0,1; 0,01; 0,001 e 0,0001 mg·mL⁻¹. O extrato da glândula de veneno foi aplicado contendo 2000; 200; 20 e 2 glândulas, considerando as mesmas concentrações dos compostos adquiridos comercialmente. O controle foi preparado com água, Tween[®] a 0,05% e 100µL de metanol. Em cada placa de Petri foi aplicado 1mL contendo os tratamentos descritos anteriormente.

As placas contendo os tratamentos foram submetidas à BOD após serem envolvidas por filme de PVC para evitar a evaporação dos extratos. Ao fim das 120h o material vegetal foi levado à estufa com temperatura de 40°C por 96h para a determinação da massa seca.

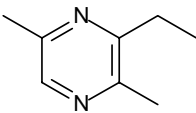




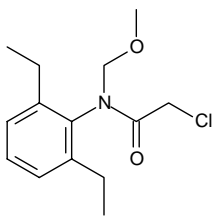




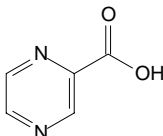









| Tratamento | Concentrações dos tratamentos | | | |
|--|---|---|---|---|
| Pirazina (1)  |  |  |  |  |
| | 0,1mg/35 sementes | 0,01mg/35 sementes | 0,001mg/35 sementes | 0,0001mg/35 sementes |
| Alaclor (9)  |  |  |  |  |
| | 0,1mg/35 sementes | 0,01mg/35 sementes | 0,001mg/35 sementes | 0,0001mg/35 sementes |
| Ácido (8)  |  |  |  |  |
| | 0,1mg/35 sementes | 0,01mg/35 sementes | 0,001mg/35 sementes | 0,0001mg/35 sementes |
| Extrato (mistura de compostos) |  |  |  |  |
| | 2000 glândulas/35 sementes | 200 glândulas /35 sementes | 20 glândulas/35 sementes | 2 glândulas/35 sementes |
| Solução veículo |  | Controle (água, Tween a 0,05% e 100 μ l de metanol) | | |

Figura 2.5 – Esquema representativo delineamento experimental montado no sistema inteiramente casualizado do biensaio de atividade herbicida do extrato da glândula de veneno de *Atta sexdens rubropilosa*. São mostrados os constituintes dos tratamentos e a concentração em que foram aplicados.

- Análise química dos extratos

Os constituintes do extrato foram analisados usando a técnica de cromatografia gasosa aliada à espectrometria de massas (CG-EM), e pela espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS).

As análises de CG-EM do extrato foram feitas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas AGILENT 6890N. Coluna DB-5 (30 m X 0,25 mm). O programa de temperatura foi o seguinte: injetor = 200 °C; detector = 260 °C; temperatura inicial da análise = 50 °C (por 1 min); temperatura final da análise = 260 °C (por 7 min) e taxa de aquecimento = 5 °C·min⁻¹ (tempo total de aquecimento = 42 min).

Nas análises por UPLC-ESI-MS/MS (Cromatografia Líquida de Ultra Performance- Ionização por Electrospray- Espectrometria de Massas Sequencial no Espaço), foi utilizado um cromatógrafo Waters nanoAcquity UPLC, acoplado diretamente à fonte de ESI do espectrômetro Waters Synapt HDMS. O cromatógrafo foi equipado com uma coluna Waters Atlantis dC₁₈ (300 µm diâmetro interno x 150 mm comprimento, partículas de 3 µm), mantida a 35°C durante as corridas. As amostras foram diluídas em H₂O e injetadas (1 a 5 µL), sendo eluídas com gradientes lineares de 95:5 H₂O/MeCN contendo 0,1% ácido fórmico a 5:95% H₂O/MeCN contendo 0,1% ácido fórmico, a um fluxo de 16 µL min⁻¹.

Dentre condições fixas do espectrômetro de massas estão voltagem do capilar 3,0 kV e voltagem do cone 20 V. Durante cada corrida, espectros de MS e MS/MS foram adquiridos a uma taxa de 1 espectro s⁻¹ no modo DDA. Nesse modo, o instrumento adquire espectros de MS constantemente durante a corrida. Quando um determinado espectro de MS contém sinais de compostos de interesse para experimentos de MS/MS, o instrumento ajusta o quadrupolo para selecionar íons daquela razão *m/z* e os fragmenta, adquirindo espectros de MS/MS, e retorna à função MS em seguida. As análises foram feitas nos modos negativo, ESI(-)MS, e positivo, ESI(+)MS. Para ESI(-)MS foram adicionados 1 µL de ácido fórmico. E para ESI(-)MS adicionaram-se 1 µL de hidróxido de amônio. Os espectros de massa foram adquiridos na faixa de massa/carga (*m/z*) de 40 até 700.

- Análise estatística

Os dados obtidos para massa seca (mg/ 7 plântulas) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade de erro. O comprimento radicular foi medido e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste χ^2 . As análises estatísticas foram realizadas com o programa Origin Lab 8.0[®].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente bioensaio o efeito herbicida do extrato da glândula de veneno foi avaliado sobre sementes pré-germinadas de alface, *Lactuca sativa*. Por apresentar alta sensibilidade, alface é uma espécie bioindicadora utilizada em vários estudos (COUTINHO & HASHIMOTO, 1971; HEISEY, 1996; ALVES *et alii*, 1999 e ABDELGALEIL & HASHINAGA, 2007).

A Tabela 2.2 resume a média das massas seca e respectivos valores de desvio padrão (SD), para os tratamentos aplicados nas concentrações descritas.

Tabela 2.2 - Médias de massa seca das plântulas de alface tratadas com diferentes compostos nas concentrações de 0,1; 0,01; 0,001 e 0,0001 mg·mL⁻¹ e os respectivos valores de desvio padrão (SD).

| Tratamentos | Concentrações | | | | | | | |
|---------------------|---------------|---------|------------|--------|------------|---------|------------|---------|
| | 0,0001 | | 0,001 | | 0,01 | | 0,1 | |
| | Massa (mg) | SD | Massa (mg) | SD | Massa (mg) | SD | Massa (mg) | SD |
| Solução | 0,0235 a | 0,0011 | 0,0235 a | 0,0011 | 0,0235 a | 0,0011 | 0,0235 a | 0,0011 |
| Extrato | 0,0223 a | 0,0015 | 0,0220 a | 0,0015 | 0,0176 ab | 7,08e-4 | 0,0102 c | 9,050-4 |
| Acido (8) | 0,0232 a | 0,0012 | 0,0230 a | 4,8e-4 | 0,0170 b | 6,06e-4 | 0,0100 c | 8,05e-4 |
| Pirazina (2) | 0,0238 a | 9,37e-4 | 0,0243 a | 0,0011 | 0,0204 a | 4,46e-4 | 0,0174 b | 4,46e-4 |
| Alaclor (9) | 0,0238 a | 7,04e-4 | 0,0230 a | 4,0e-4 | 0,0174 ab | 8,47e-4 | 0,0111 c | 0,0026 |

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si segundo o teste de Tukey ($p < 0,01$)

Na tabela 2.3 estão as médias do comprimento radicular das plântulas após serem postas na BOD (0h) e quando o experimento foi encerrado (120h), assim como os respectivos valores de desvio padrão.

Tabela 2.3 - Médias do comprimento radicular das plântulas de alface tratadas com diferentes compostos nas concentrações de 0,1; 0,01; 0,001 e 0,0001 mg·mL⁻¹, no início e no fim (120h) do bioensaio (0h), assim como os respectivos valores de desvio padrão (SD).

| Concentrações | 0,0001 | | | | 0,001 | | | | 0,01 | | | | 0,1 | | | |
|---------------------|---|------|----------|------|---------|------|----------|------|---------|------|----------|------|---------|------|----------|------|
| | Tempo de medição do comprimento radicular | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tratamentos | 0h (cm) | | 120h(cm) | | 0h (cm) | | 120h(cm) | | 0h (cm) | | 120h(cm) | | 0h (cm) | | 120h(cm) | |
| Solução | 2,6 | 0,45 | 4,4 | 0,41 | 2,6 | 0,45 | 4,4 | 0,37 | 2,6 | 0,45 | 4,4 | 0,37 | 2,6 | 0,45 | 4,4 | 0,37 |
| Extrato | 2,4 | 0,39 | 4,0 | 0,37 | 2,4 | 0,36 | 4,0 | 0,32 | 2,5 | 0,33 | 3,9* | 0,32 | 2,5 | 0,43 | 2,7* | 0,43 |
| Acido (8) | 2,5 | 0,43 | 4,2 | 0,41 | 2,4 | 0,41 | 4,1 | 0,38 | 2,5 | 0,36 | 3,9* | 0,30 | 2,5 | 0,39 | 2,7* | 0,40 |
| Pirazina (2) | 2,5 | 0,42 | 4,2 | 0,32 | 2,5 | 0,40 | 4,3 | 0,43 | 2,4* | 0,38 | 3,8* | 0,40 | 2,3* | 0,33 | 2,8* | 0,34 |
| Alaclor (9) | 2,6 | 0,46 | 4,4 | 0,45 | 2,5 | 0,46 | 4,2 | 0,43 | 2,6 | 0,45 | 3,6* | 0,47 | 2,6 | 0,43 | 2,9* | 0,43 |

* Médias diferentes do controle segundo o teste de χ^2 ($p < 0,01$)

A resposta mais significativa foi observada para os tratamentos na concentração de 0,1 mg·mL⁻¹, Figura 2.6.

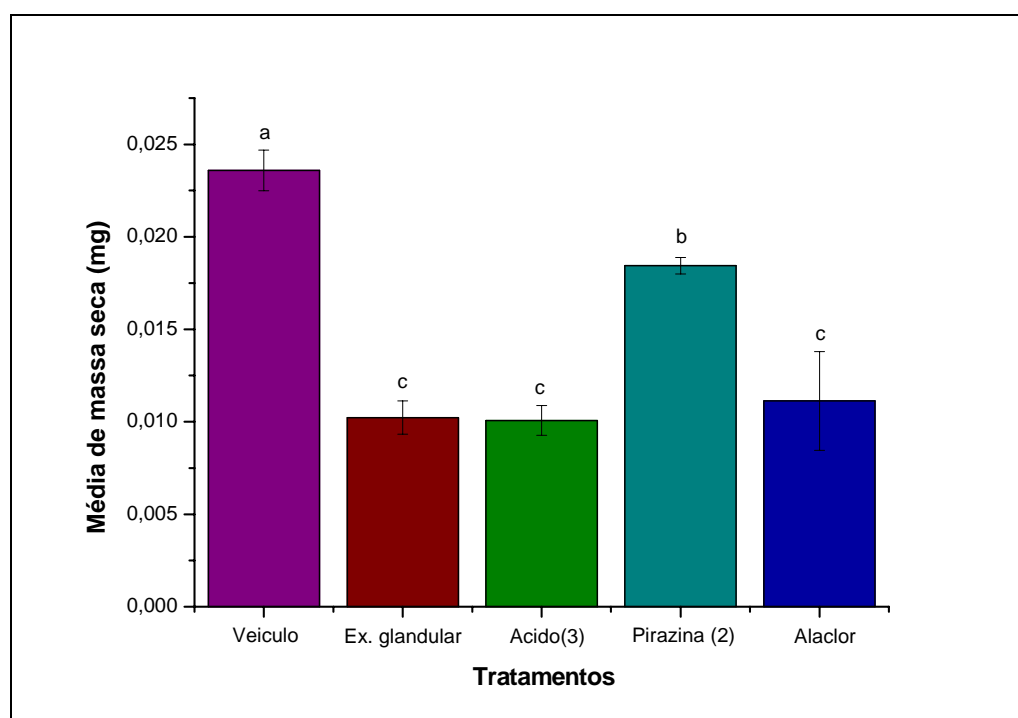


Figura 2.6 - Massa seca de plântulas de alface, *Lactuca sativa*, após serem acometidas à BOD por 120h. O resultado refere-se à aplicação dos tratamentos na concentração de 0,1 mg·mL⁻¹. Letras distintas indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,01$).

O extrato de glândula de veneno mostrou atividade estatisticamente comparável ao herbicida comercial Alaclor (9) e ao ácido (8). Assim como, atividade herbicida superior à pirazina (2), principal constituinte do feromônio de trilha de *Atta sexdens rubropilosa*. A redução da massa seca para o tratamento com EGV na concentração 0,1 mg·mL⁻¹ foi acompanhado pela diminuição o comprimento radicular das plântulas. Fato que pode ser observado na tabela 1.3 e na figura 2.7, onde são exibidas as fotos das placas de Petri referentes aos tratamentos aplicadas na concentração de 0,1mg·mL⁻¹.

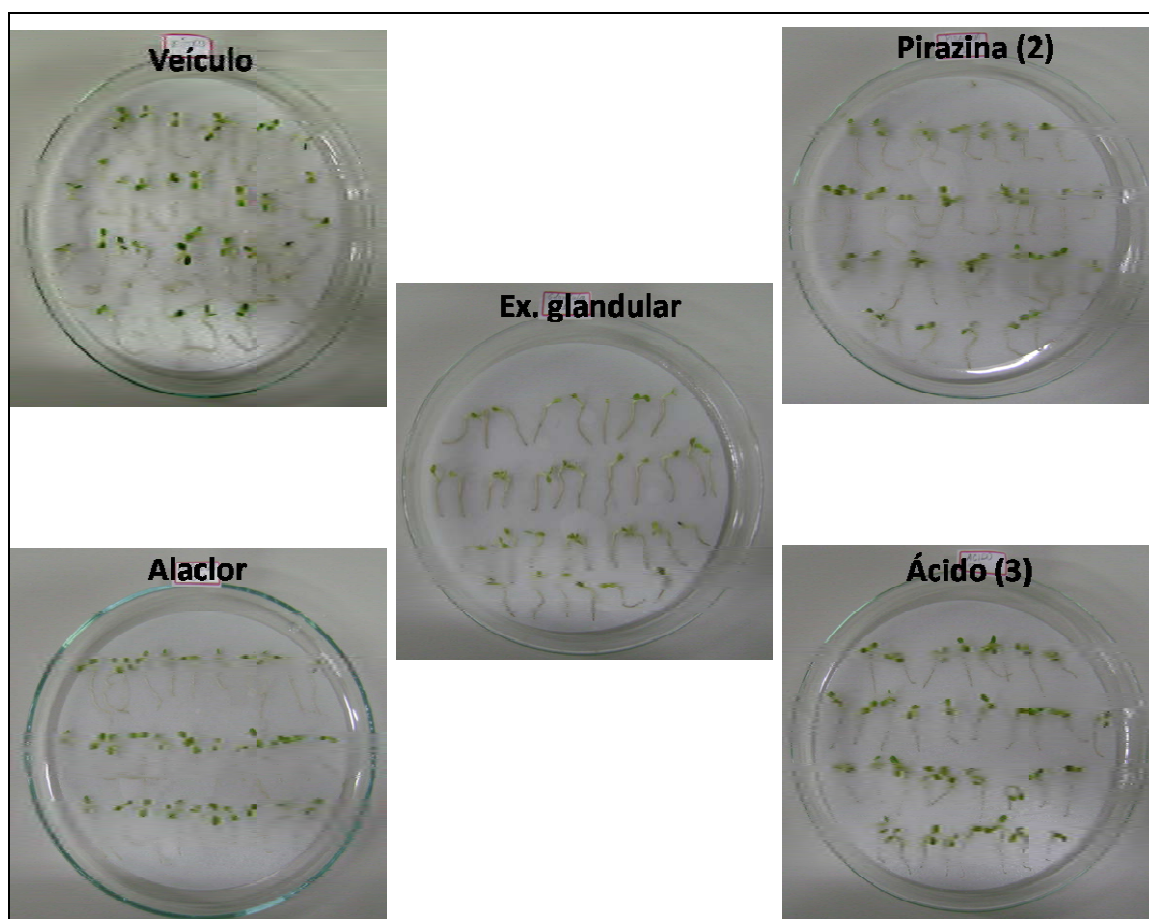


Figura 2.7 - Plântulas de *Lactuca sativa* referente à aplicação dos tratamentos na concentração de 0,1mg/ml após 120h do início do bioensaio.

Alguns dos inibidores fotossintéticos que apresentam semelhança estrutural com a pirazina (**2**) presente na glândula de veneno agem na transferência de elétrons nos cloroplastos de espinafre. As plântulas tratadas com extrato da glândula de veneno apresentavam coloração e aspectos diferentes dos demais tratamentos. Estas estavam mais amareladas e com as folhas murchas. Tais fatos podem estar relacionada à inibição dos elétrons fotossintéticos envolvidos na cadeia transportadora que liberam energia utilizada na produção de ATP (DOLEZAL *et alii*, 2002).

Os resultados do bioensaio suportam o indício da atividade herbicida dos constituintes presentes na glândula de veneno de formigas cortadeiras. Assim como a possível existência de um derivado ácido, que pode estar sendo produzido nesta glândula. Com as análises químicas foi possível detectar os compostos feromonais já descritos na literatura (CROSS *et alii*, 1979), bem como a presença de novas substâncias. Os principais compostos detectados com o uso da CG-EM são mostrados na Figura 2.8.

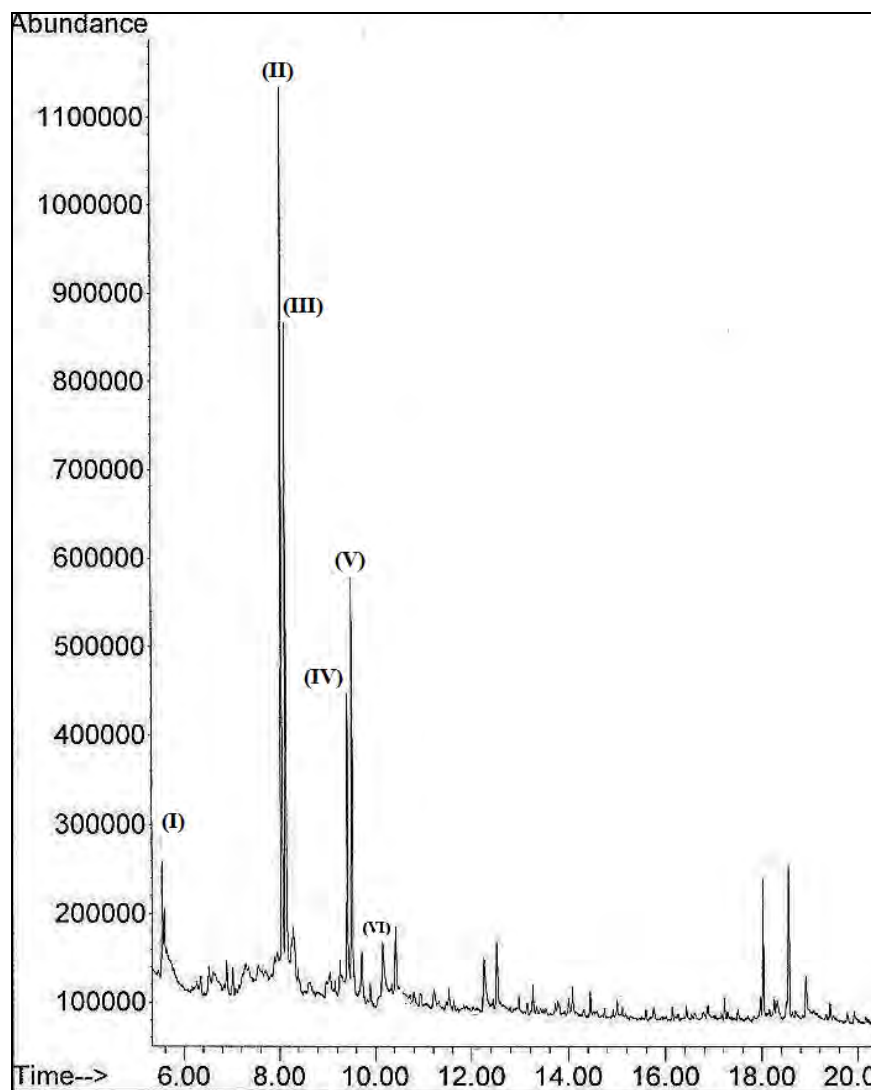


Figura 2.8 – Cromatograma total de íons obtido pela técnica de cromatografia gasosa aliada à espectroscopia de massas para o extrato da glândula de veneno, com indicação dos sinais cujas estruturas foram sugeridas.

A partir dos espectros de fragmentação, as estruturas sugeridas para os principais sinais do espectro de massas são apresentadas na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Sinais presentes no espectro de massas do extrato da glândula de veneno, com os respectivos tempos de retenção e nome sugerido para os compostos.

| Sinal | Tempo de retenção (min) | Composto sugerido | Anexos |
|-------|-------------------------|---------------------------------------|------------|
| I | 5,541 | 2,5 - dimetilpirazina | Apêndice A |
| II | 8,044 | 3-etil-2,5-dimetilpirazina | Apêndice B |
| III | 8,128 | 2-etil-3,5-dimetilpirazina | Apêndice C |
| IV | 9,417 | 3-acetil-2,5-dimetilpirazina | Apêndice D |
| V | 9,514 | 2-acetil-3,5-dimetilpirazina | Apêndice E |
| VI | 10,209 | 4-metil-2-pirrolcarboxilato de metila | Apêndice F |

A Figura 2.9 mostra o cromatograma gerado na análise do EGV por meio da ionização por *electrospray*.

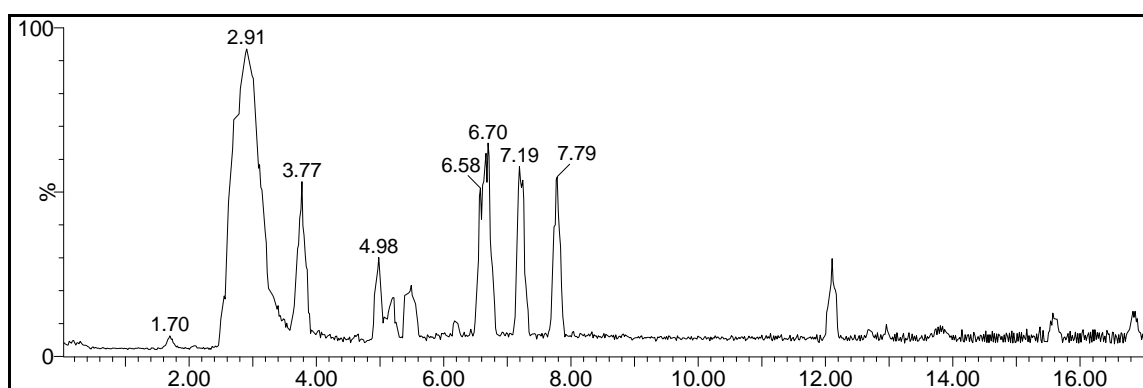


Figura 2.9 - Análise cromatográfica do extrato da glândula de veneno pela ionização por *electrospray*.

Os compostos identificados na glândula de veneno de *A. sexdens rubropilosa* por CROSS *et alii* (1979) foram os seguintes:

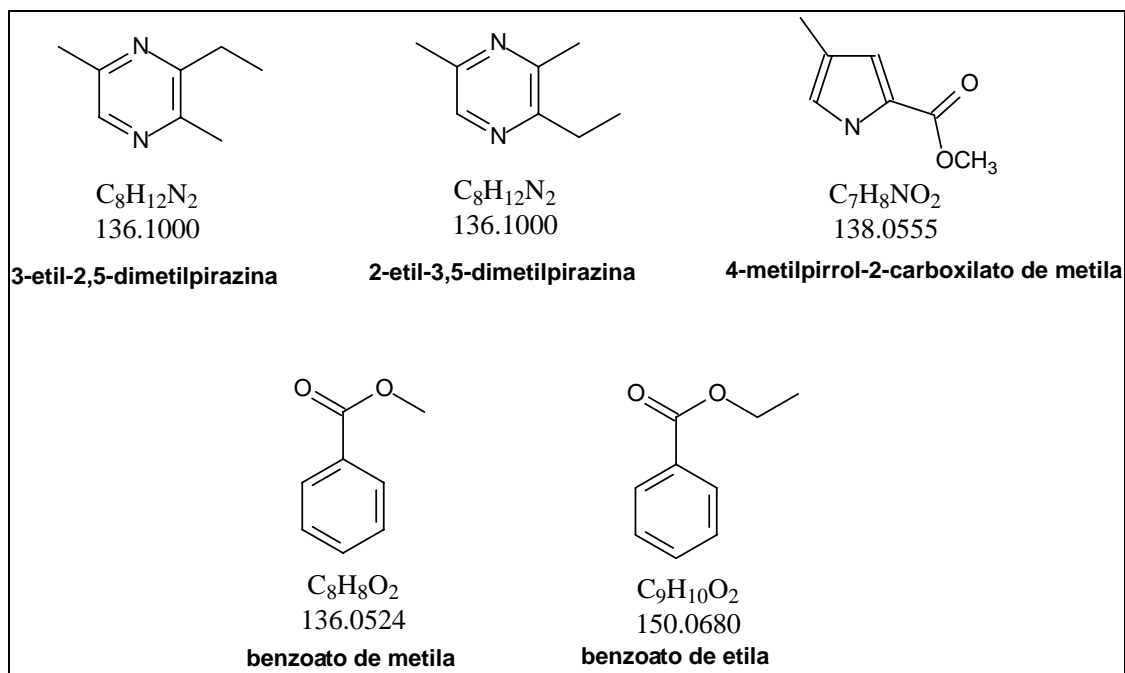


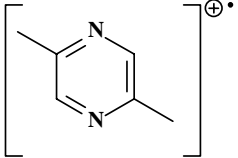
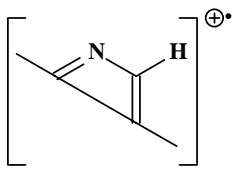
Figura 2.10 – Constituintes da glândula de veneno de *Atta sexdens rubropilosa* identificados por CROSS *et alii* (1979).

Com a análise química do EGV por meio da CG-EM, foi possível detectar as pirazinas e o pirrol presentes na Figura 2.10, além de outro derivado da pirazina que não fora descrito anteriormente como presente na glândula de veneno de *A. sexdens rubropilosa*. Estes compostos correspondem aos sinais **(I)**, **(II)**, **(III)** e **(VI)** do cromatograma mostrado na Figura 2.8.

No espectro de massas do sinal **(I)** observa-se o íon $m/z=108$ (APÊNDICE A). Este poderia corresponder ao íon molecular da 2,5-dimetilpirazina **(10)**. Este composto foi detectado na glândula de veneno de somente uma espécie de *attine* até o momento: a *A. sexdens sexdens* (MORGAN *et alii*, 2006). Para outras espécies da subfamília Myrmicinae a 2,5-dimetilpirazina teve atividade como feromônio de trilha comprovada: *Pogonomyrmex barbatus*, *Pogonomyrmex badius*, *Pogonomyrmex occidentalis* e *Pogonomyrmex rugosus* (HÖLLDOBLER & MORGAN, 2001). Assim como para duas espécies da subfamília Ponerinae, *Tetramorium caespitum* (ATTYGALLE & MORGAN, 1984) e *Tetramorium meridionale* (JACKSON *et alii*, 1990).

Outros íons e possíveis fragmentações são mostrados na Tabela 2.5. A correlação entre o espectro obtido e a biblioteca do sistema operacional do cromatógrafo foi de 96%, o que indica uma boa relação sinal ruído na análise e uma concordância boa 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).

Tabela 2.5 - Prováveis fragmentações no espectrômetro de massas (EM-IE) para a 2,5-dimetilpirazina (**2**).

| Íons (m/z) | Fragmento liberado | Fragmento iônico |
|----------------|---|------------------|
| 108 |  | Íon molecular |
| 81 |  | H—C≡N |

Os sinais (**II**) e (**III**) referem-se à 3-etil-2,5-dimetilpirazina e ao isômero 2-etil-3,5-dimetilpirazina (APÊNDICE B e C). A correlação entre o espectro obtido e a biblioteca do sistema operacional do cromatógrafo foi de 98%. Nos cromatogramas pode-se observar os sinais característicos de m/z 42, 56, 135.

Com o uso da ESI-MS também foi possível encontrar o íon referente à 3-etil-2,5-dimetilpirazina (APÊNDICE G). Na Figura 2.11 são mostradas as estruturas dos dois fragmentos iônicos mais intensos presentes no espectro da pirazina.

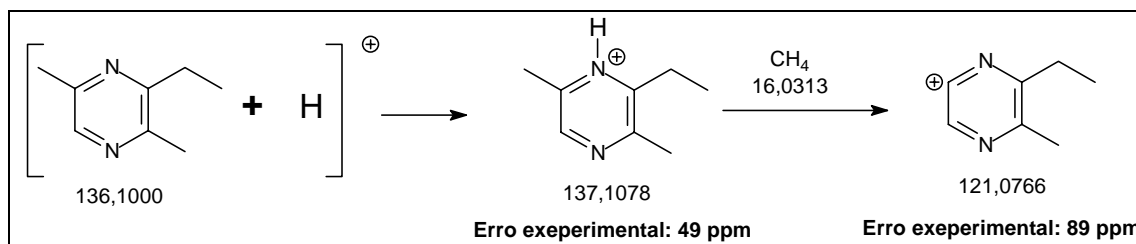


Figura 2.11 – Fragmentos iônicos mais intensos presentes no espectro MS-ESI referente a 3-etil-2,5-dimetilpirazina.

O sinal (**VI**) foi identificado como o 4-metilpirrol-2-carboxilato de metila (APÊNDICE F). A semelhança estrutural obtida foi de 96%. No espectro de massas observa-se o sinal em $m/z=139$, que corresponde ao íon molecular, além de um sinal referente à espécie de $m/z=108$, cuja atribuição seria devido a uma clivagem α à carbonila característica de ésteres, Figura 2.12.

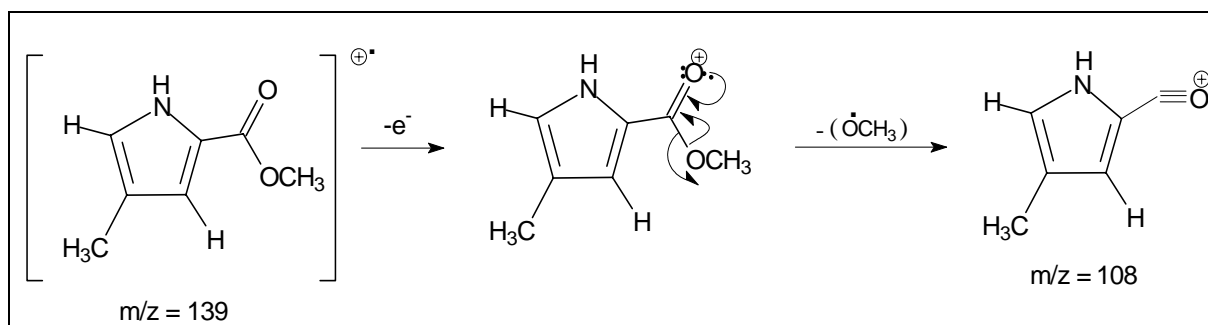


Figura 2.12 - Provável fragmentação observada no cromatograma de CG-EM para os íons mais intensos do pirrol (**1**).

Os sinais (**IV**) e (**V**) foram indicados pela biblioteca como sendo 2-acetil-3,5-dimetilpirazina (**11**), ou prováveis isômeros de posição. O íon molecular da estrutura apresenta $m/z=150$ (APÊNDICES D e E). O benzoato de etila, composto identificado por CROSS *et alii* (1978) na glândula de veneno de *Atta sexdens rubropilosa*, também apresenta massa molecular 150 e o íon molecular $m/z=150$ no espectro de massas, Figura 1.14. Avaliando o espectro de fragmentação obtido, é possível notar que os íons gerados são condizentes com a 2-acetil-3,5-dimetilpirazina, como é exemplificado na Figura 2.13.

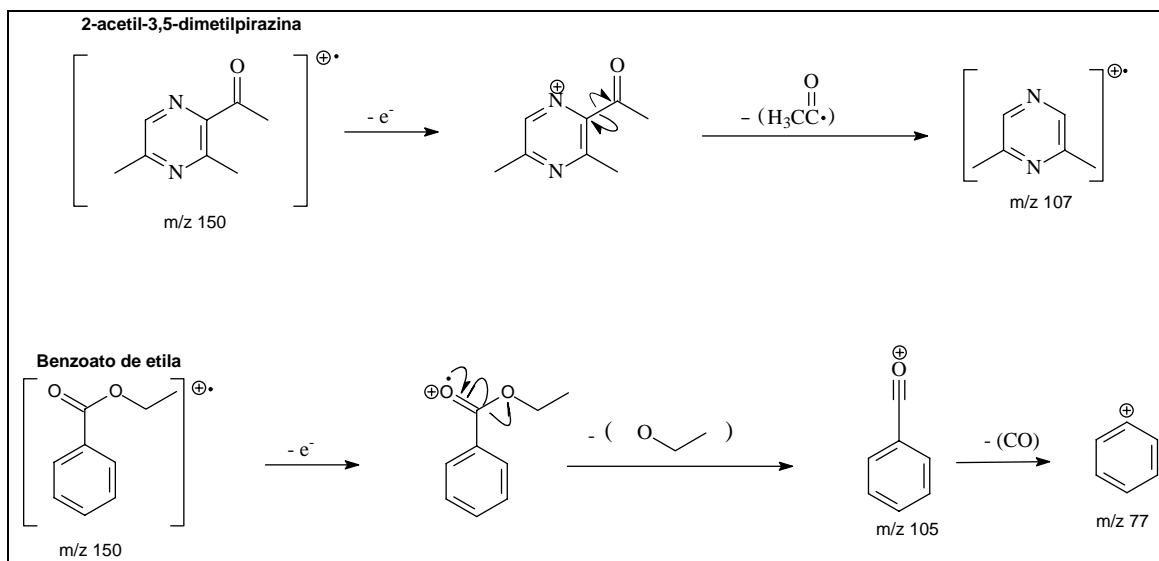
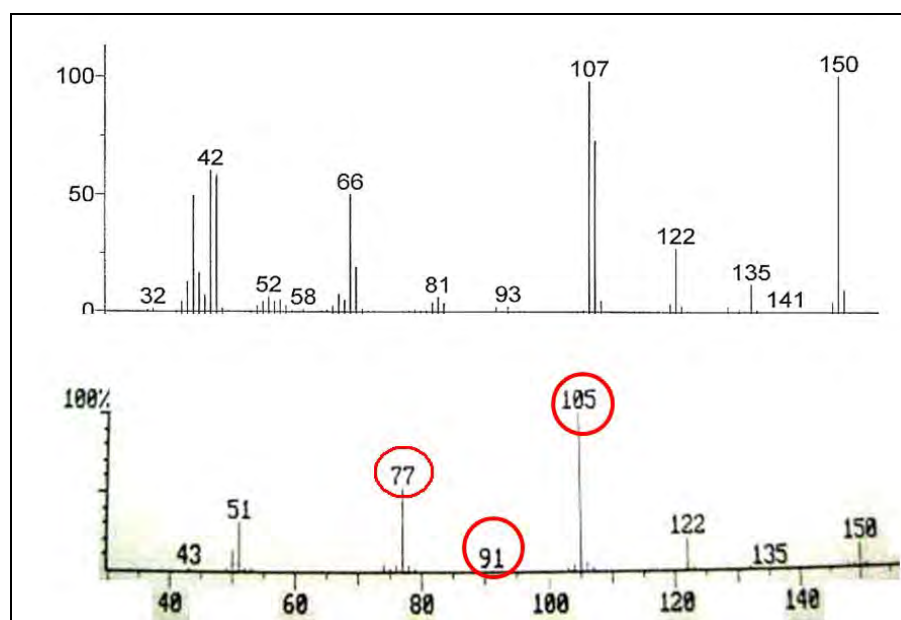


Figura 2.13 – Comparação entre os fragmentos que apresentam maior porcentagem em relação ao pico base para 2-acetil-3,5-dimetilpirazina e benzoato de metila.

Na Figura 2.14 é feita uma comparação entre os fragmentogramas do benzoato de etila e o obtido experimentalmente.



FONTE: ADAMS, 1995.

Figura 2.14 – Comparação entre os espectros de massas obtidos experimentalmente (parte superior) e o espectro do benzoato de etila padrão (parte inferior).

Os três sinais característicos do benzoato de etila não estão presentes no fragmentograma de massas experimental. Estes são o íon de $m/z=105$, derivado da perda de OCH_2CH_3 , Figura 2.13. Além do íon tropílio, $m/z=91$, e $m/z=77$ fragmentos típicos de hidrocarbonetos aromáticos.

O espectro de CG-EM é corroborado pelo obtido por meio da ESI-MS. No último está presente o aduto $[\text{M} + \text{H}]^+$, $m/z=151$ (APÊNDICE H), oriundo da protonação da molécula a ser analisada. A vantagem do espectro de ESI está na aquisição dos valores de massa com exatidão de quatro casas decimais após a vírgula. Como é mostrado na Figura 2.15, as fragmentações dos adutos de hidrogênio evidenciam a presença da acetilpirazina (**11**) com erro experimental abaixo de 50 ppm.

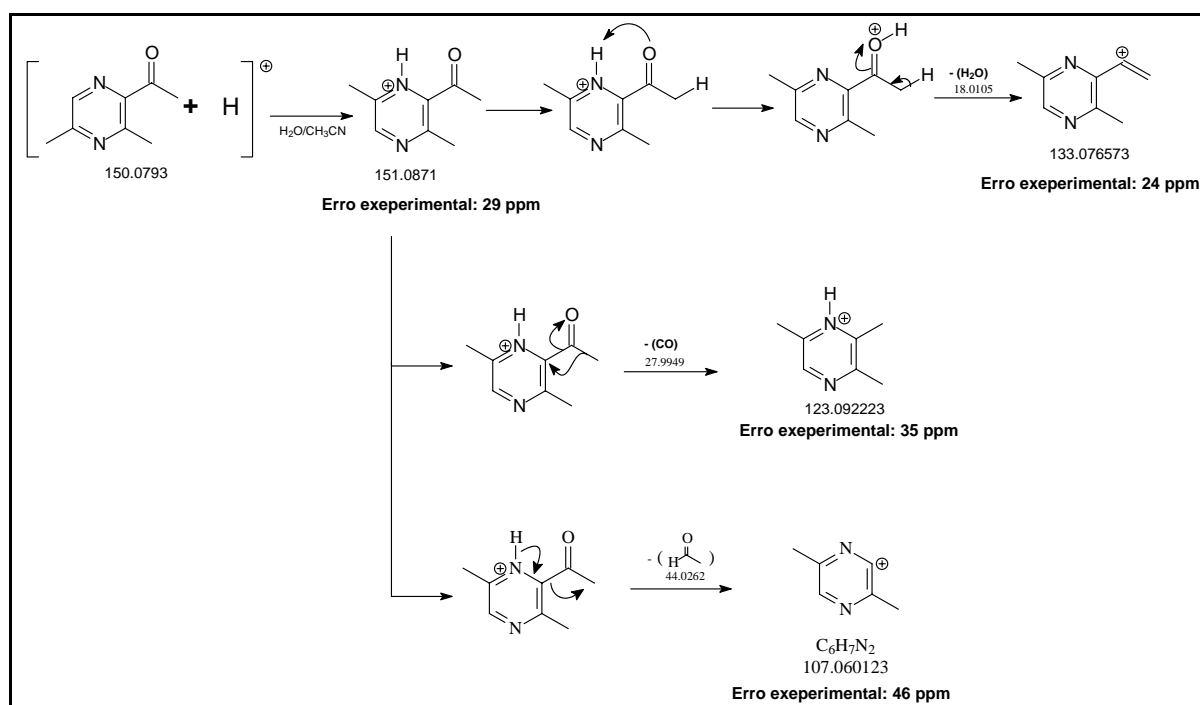


Figura 2.15 – Estruturas dos fragmentos iônicos mais intensos sugeridas para o aduto por ESI-MS $[\text{M} + \text{H}]^+$ 151.

A acetilpirazina (**11**) contribui para o aroma de chás, café e é usado como aromatizante de gêneros alimentícios (HATTORI *et alii*, 2005 e MORAES *et alii*, 2007). Não há relatos na literatura de tal composto na glândula de veneno de *Atta*

sexdens rubropilosa, ou qualquer outra espécie de formiga cortadeira. A acetilpirazina é menos volátil do que a 2-etil-3,5-dimetilpirazina em função de sua maior polaridade. Devido a função do feromônio de trilha, os trabalhos científicos sempre buscam e relacionam compostos voláteis a este feromônio (MORGAN, 2009). No primeiro trabalho que caracterizou a 2-etil-3,5-dimetilpirazina como principal componente do feromônio de trilha, foi usada uma técnica rude de extração para a caracterização deste componente. Os autores usaram 4,2kg de formigas, das quais retiraram o abdômen para a confecção do extrato (CROSS *et alii*, 1978). Fica claro que em uma extração deste tipo a complexidade do material biológico é consideravelmente maior. Além disto, da possibilidade de perda de compostos no processo de purificação do extrato não pode ser descartada.

Em 1983 Evershed e Morgan analisaram novamente os constituintes da GV de *A. sexdens rubropilosa*, mostrando que o pirrol (**1**) e pirazina (**2**) estão presentes na relação de 1:14. Apenas traços dos benzoatos de etila e metila, descritos por Cross, foram encontrados na glândula. Não há publicações desde 1983 sobre análises dos constituintes presentes na glândula de veneno de *A. sexdens rubropilosa*.

Os espectros de *electrospray* ainda apresentam sinais interessantes, como indícios de um ácido derivado da pirazina (**2**), que pode ser visto na Figura 2.16.

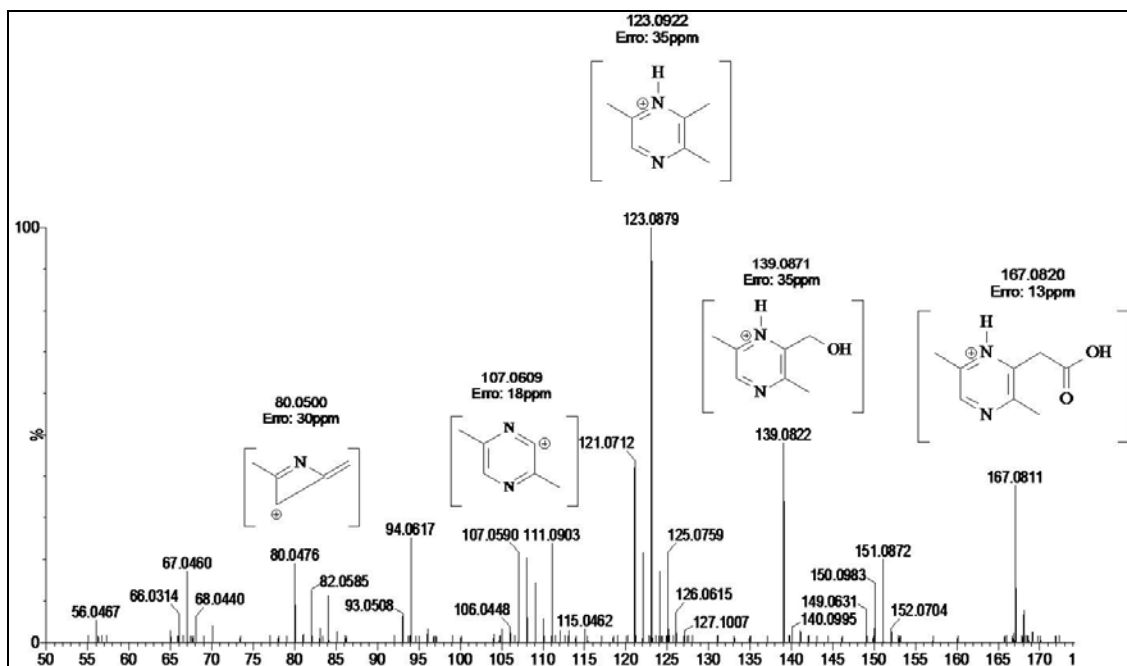


Figura 2.16 – Espectro de fragmentação do aduto de ESI-MS $[M + H]^+ = 167$, assim como as estruturas sugeridas para os fragmentos iônicos mais intensos.

Além deste está presente o derivado da função álcool, Figuras 2.17.

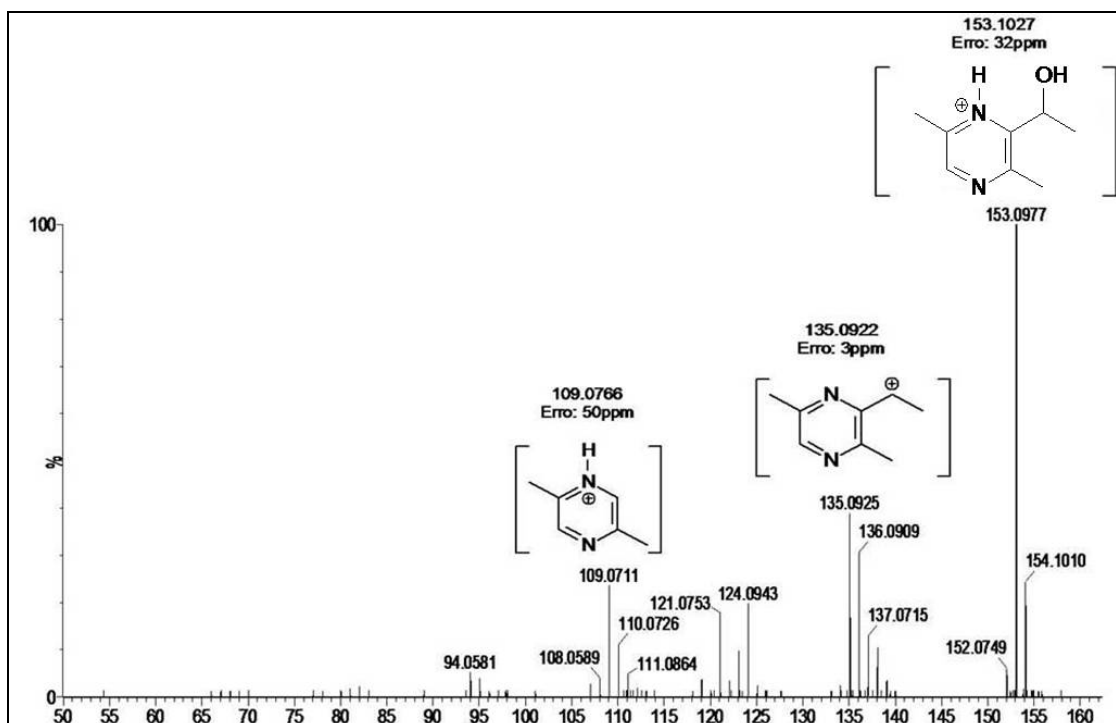


Figura 2.17 – Espectro de fragmentação do aduto de ESI-MS $[M + H]^+ = 153$, assim como as estruturas sugeridas para os fragmentos iônicos mais intensos.

Tais estruturas sugerem uma possível rota biossintética para a produção de um derivado ácido da pirazina (**2**) presente na glândula de veneno. As estruturas apresentam erro experimental da massa exata abaixo de 50ppm. As fragmentações são condizentes com o grupo funcional apresentado e com estruturas que contenham o anel aromático pirazina, evidenciado pelos adutos de massa $[M + H] = 107,06$ ou $[M + H] = 109,07$. Os íons sugeridos nas Figuras 2.15 e 2.16 correspondem a compostos mais polares e estão em menor concentração no espectro de *electrospray*. Razão pela qual há maior dificuldade na análise por cromatografia gasosa. Além disso, o derivado ácido não seria identificado por CG-EM.

Para confirmação destas estruturas são necessárias análises mais detalhadas. Uma alternativa seria a tentativa de fracionamento do extrato. Assim, isolando as moléculas seria possível realizar outros métodos de análise para elucidação estrutural. A co-injeção do composto sintético equivalente também é uma alternativa. Desta forma é possível comparar o tempo de retenção e perfil de fragmentação entre o composto conhecido (comercial) e aquele que está buscando a estrutura.

A proposta deste trabalho foi buscar uma atividade herbicida do feromônio de trilha, que neste caso estaria exercendo uma dupla função. Ou ainda a presença de outro composto que atuara como herbicida. Com o bioensaio foi possível constatar que a pirazina (**2**) apresenta esta atividade. O efeito herbicida é mais evidente para o EGV, que é estatisticamente equivalente ao herbicida comercial alaclor (**9**). Como os espectros obtidos indicam a presença da 2-acetil-3,5-dimetilpirazina na relação de 1:4 com a pirazina (**2**) no EGV, pode-se inferir que esta tenha importante papel no efeito herbicida observado. Além disso, a significativa atividade pode ser produto de um efeito sinérgico entre os constituintes glandulares.

CONCLUSÃO

Os resultados fortalecem a tese de atividade herbicida de constituintes da glândula de veneno. Sendo um forte indício da ocorrência de capina química nas trilhas de forrageamento por parte das formigas cortadeiras. Assim, a dupla função dos compostos feromonais ou a presença de algum composto com atividade herbicida específica, implicaria em economia de tempo e energia para a colônia.

A análise química do extrato indica duas novas substâncias presentes na glândula de veneno de *Atta sexdens rubropilosa* que são 2-5-dimetilpirazina e 2-acetil-3,5-dimetilpirazina. Outros compostos propostos pelos espectros de *elestrospray* ainda sugerem a presença de um derivado ácido da pirazina (2), assim como intermediários que podem estar envolvidos em uma rota biossintética na produção deste.

O efeito herbicida dos constituintes da glândula de veneno propicia maior eficiência na atividade de forrageamento, pois além de orientação contribui para a manutenção da limpeza da trilha. Fato que corroboraria as afirmações sobre o grande sucesso evolutivo das formigas cortadeiras da tribo Attini.

REFERÊNCIAS

ABDELGALEIL, S.A.M. e HASHINAGA, F. Allelopathic potential of two sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p.737-742, 2007.

ADAMS, R. **Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Allured Publ Corp., Carol Stream, IL, USA, 469p. 1995. Pág. 154.

ALVES, P.L.C.A.; TOLEDO, R.E.B. e GUSMAN, A.B. Allelopathic potential of *Eucalyptus* spp. In: NARWAL, S.S. (Ed.) **Allelopathy Update**. Enfield, Science Pub., v.2, p.131-148, 1999.

AMARO, R.E.; MYERS, R. S.; DAVISSON, V. J. e LUTHEY-SCHULTEN, Z. A. Structural Elements in IGP Synthase Exclude Water to Optimize Ammonia Transfer. **Biophysical Journal**, v. 89, p. 475-487, 2005.

ATTYGALLE, A.B. e MORGAN, E.D. Identification of trail pheromone of the ant *Tetramorium caespitum* L. (Hymenoptera: Myrmicinae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 10, p. 1453-1468, 1984.

BURD, M., ARCHER, D., ARANWELA, N. e TRADLING, D. Traffic dynamics of the leafcutting ant, *Atta cephalotes*. **American Naturalist**, v. 159, p. 283–293, 2002.

COOPER, W. T.; LLEWELYN, J. M.; BENNETT, G. L.; SALTERS, V. J.M. *Mass spectrometry of natural organic phosphorus*. **Talanta**, v.66, p.348-358, 2005.

COUTINHO, L.M. e HASHIMOTO, F. Sobre o efeito inibitório da germinação de sementes produzido por folhas de *Calea cuneifolia* DC. **Ciência e Cultura**, v.23, n.6, p.759-764, 1971.

CROSS, J.H., BYLER, R.C., RAVID, U., SILVERSTEIN, R.M., ROBINSON, S.W., BAKER, P.M., JUTSUM, A.R., CHERRETT, J.M. e DE OLIVEIRA, J.S. The major component of the trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa* Forel: 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine. **Journal of Chemical Ecology**, v.5, p.187-203, 1979.

CROSS, J.H., WEST, J.R., SILVERSTEIN, R.M., JUTSUM, A.R. e CHERRETT, J.M. Trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Acromyrmex octospinosus* (Reich), (Formicidae: Myrmicinae), **Journal of Chemical Ecology**, v. 8, p. 1119-1124, 1982.

DANCER, J.E.; FORD, M.J.; HAMILTON, K.; KILKELLY, M.; LINDELL, S.D.; O'MAHONY, M.J. e SAVILLE-STONES, E. A. Synthesis of potent inhibitors of histidinol dehydrogenase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 17, p. 2131-2136, 1996.

DOLEZAL, M.; ZITKO, J.; KESETOVICOVÁ, D.; KUNES, J. e SVOBODOVÁ, M. Substituted *N*-Phenylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and Antimycobacterial Evaluation. **Molecules**, v. 14, p. 4180-4189, 2009.

DOLEZAL, M.; HARTL, J.; LYCKA, A.; BUCHTA, V. e ODLEROVÁ, Z. Synthesis and antituberculous properties of some substituted pyrazinecarbothioamides. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 61, p. 1102–1108, 1996.

DOLEZAL, M.; HARTL, J.; MILETÍN, M.; MACHÁČEK, M. e KRÁLOVÁ, K. Synthesis and photosynthesis-inhibiting activity of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids. **Chemical Papers**, v. 53, p. 126-130, 1999.

DOLEZAL, M.; VICÍK, R.; MILETÍN, M. e KRÁLOVÁ, K. Synthesis and antimycobacterial, antifungal, and photosynthesis-inhibiting evaluation of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids. **Chemical Paper**, v. 54, p. 245–248, 2000.

DOLEZAL, M.; PALEK, L.; VINSOVÁ, J.; BUCHTA, V.; JAMPÍLEK, J. e KRÁLOVÁ, K. Substituted pyrazinecarboxamides; synthesis and their biological evaluation. **Molecules**, v. 11, p. 242–256, 2006.

DOLEZAL, M.; TUMOVÁ, L.; KESETOVICOVÁ, D.; TUMA, J. e KRÁLOVÁ, K. Substituted *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides, their synthesis and evaluation as herbicides and abiotic elicitors. **Molecules**, v. 12, p. 2589–2598, 2007.

DOLEZAL, M.; CMEDLOVÁ, P.; PALEK, L.; VINSOVÁ, J.; KUNES, J.; BUCHTA, V.; JAMPÍLEK, J. e KRÁLOVÁ, K. Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides. **European Journal of Entomology** v. 43, p. 1105–1113, 2008.

EVERSHED, R.P. e MORGAN, E.D. The amounts of trail pheromone substances in the venom of workers of four species of attine ants. **Insect Biochemistry**, v. 13, p. 469-474, 1983.

FREDERICKSON, M.E.; GREENE, M.J. e GORDON, D.M. 'Devil's gardens' bedevilled by ants. **Nature**, v. 437, p. 495–496, 2005.

HATTORI, S.; TAKAGAKI, H. e FUJIMORI, T. Identification of Volatile Compounds which Enhance Odor Notes in Japanese Green Tea using the OASIS (Original Aroma Simultaneously Input to the port) method. **Food Science and Technology**, v. 11, p. 171-174, 2005.

HIGASHIO, Y. e SHOJI, T. Heterocyclic compounds such as pyrrole, pyridines, pyrrolidine, piperidine, indole, imidazol and pyrazines. **Applied Catalysis A: General**, v. 260, p. 251-259, 2004.

HEISEY, R.M. Identification of an allelopathic compound from *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) and characterization of its herbicidal activity. **American Journal of Botany**, v.83, n.2, p.192-200, 1996.

HÖLLDOBLER, B.; MORGAN, E.D.; OLDHAM, N.J. e LIEBIG, J. Recruitment pheromone in the harvester ant genus *Pogonomyrmex*. **Journal of insect physiology**, v. 47, p.369-374, 2001.

HOWARD, J.J. Costs of trail construction and maintenance in the leaf-cutting ant *Atta columbica*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 49, p. 348-356, 2001.

JACKSON, B.D.; KEEGANS, S.J.; MORGAN, E.D.; CAMMAERTS, M.C. e CAMMAERTS, R. Trail pheromone of the ant *Tetramorium meridionale*. **Naturwissenschaften**, v. 77, p.294-296, 1990.

JAFFÉ, K. e HOWSE, P.E. The mass recruitment system of leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Animal Behavior**, v. 27, p. 930-939, 1979.

JONES, G.R. e OLDHAM, N.J. Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 843, p. 199–236, 1999.

KOST, C.; GAMA DE OLIVEIRA, G.; KNOCH, T. e WIRTH, R. Spatio-temporal permanence and plasticity of foraging trails in young and mature leaf-cutting ant colonies (*Atta* spp.). **Journal of Tropical Ecology**, v. 21, p. 677–688, 2005.

LEWIS, T.; POLLARD, G.V. e DIBLEY G.C. Rhythmic foraging in the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.) (Formicidae: Attini). **Journal of Animal Ecology**, v. 43, p. 129–142, 1974.

MORGAN E.D. Preparation of small-scale samples from insects for chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 236, p. 227–235, 1990.

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

MORGAN, E.D. Trail pheromones of ants. **Physiological Entomology**, v. 34, p. 1-17, 2009.

RILEY, R.G.; SILVERSTEIN, R.M.; CARROLL, B. e CARROLL, R. Methyl 4-methylpyrrole-2-carboxylate: a volatile trail pheromone from the leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. **Journal of Insect Physiology**, v. 20, p. 651-654, 1974b.

ROBINSON, S.W. e CHERRETT, J.M. The possible use of methyl 4-methylpyrrole-2-carboxylate, an ant trail pheromone, as a component of an improved bait for leaf-cutting ant (Hymenoptera:Formicidae) **Bulletin of Entomological Research**, v. 68, p.159-170, 1978.

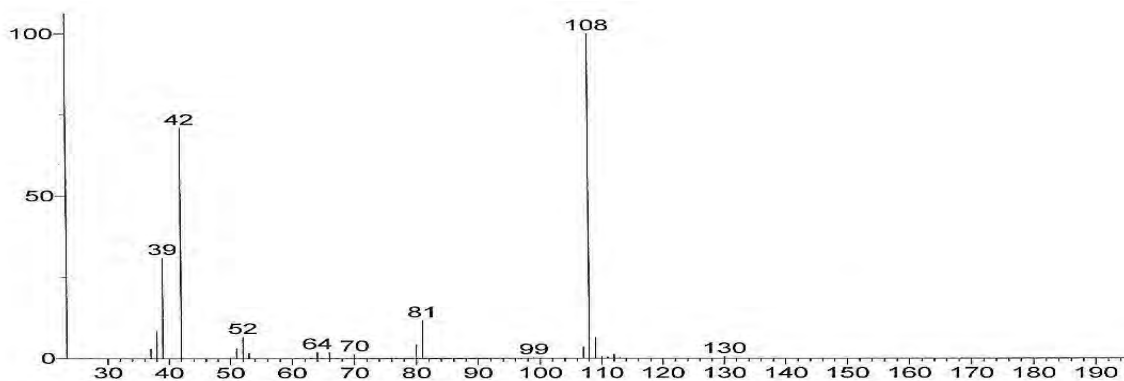
SCHWEITZER, B.A.; LOIDA, P.J.; CAJACOB, C.A.; CHOTT, R.C.; COLLANTES, E.M.; HEGDE, S.G.; MOSIER, P.D. e PROFETA S. Discovery of Imidazole Glycerol Phosphate Dehydratase Inhibitors through 3-D Database Searching. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 1743 -1746, 2002.

TUMLINSON, J.H.; SILVERSTEIN, R.M.; MOSER, J.C.; BROWNLEE R.G. e RUTH, J.M. Identification of the Trail Pheromone of a Leaf-cutting Ant, *Atta texana*. **Nature**, v. 234, p. 348-349, 1971.

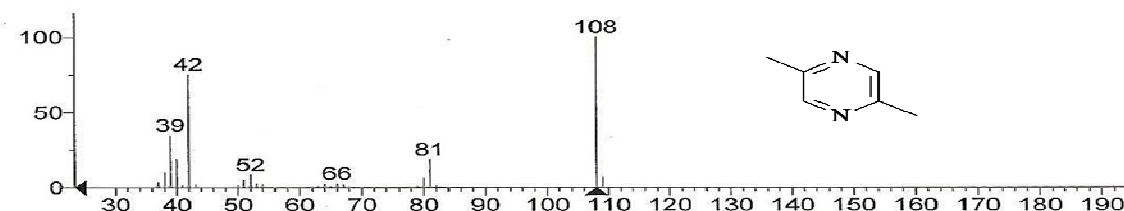
APÊNDICES

APÊNDICE A – Espectro de massas correspondente ao sinal (I) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula de veneno.

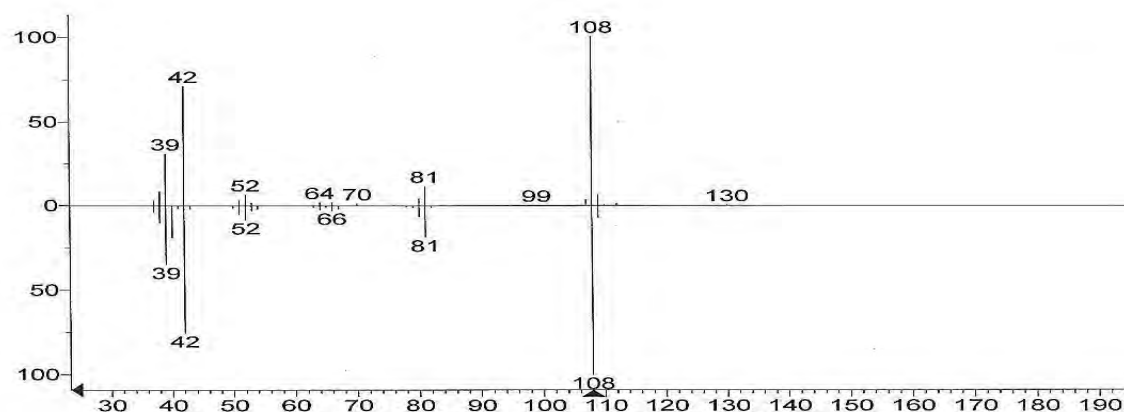
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

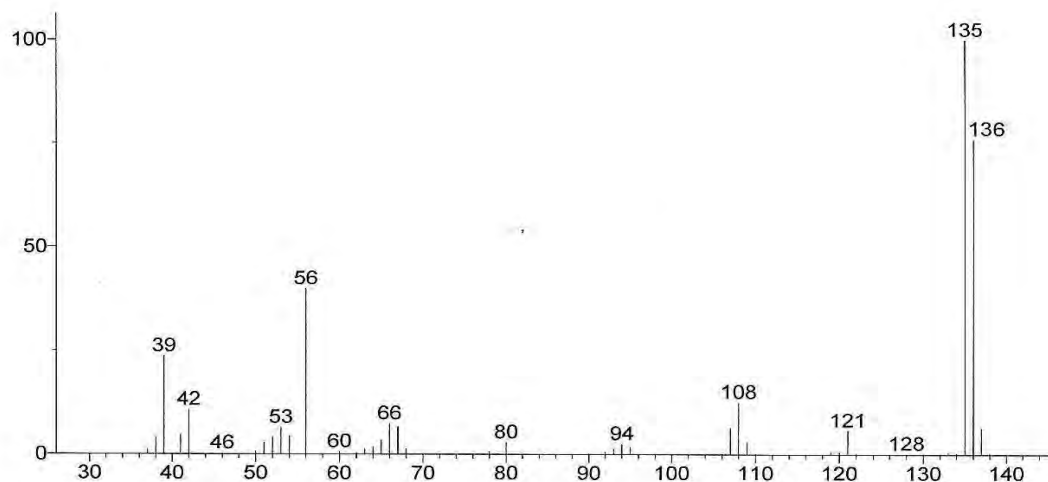


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

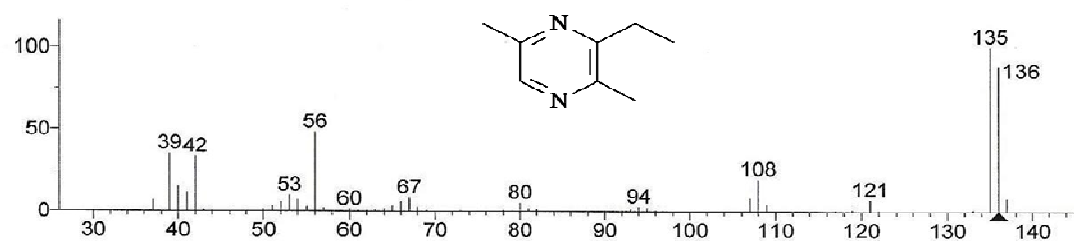


APÊNDICE B – Espectro de massas correspondente ao sinal (II) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula de veneno.

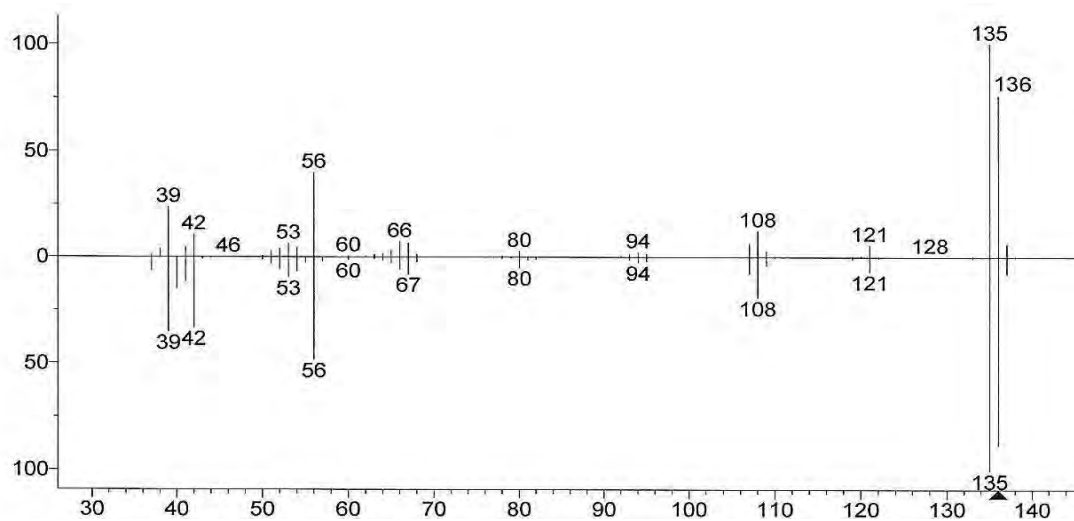
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

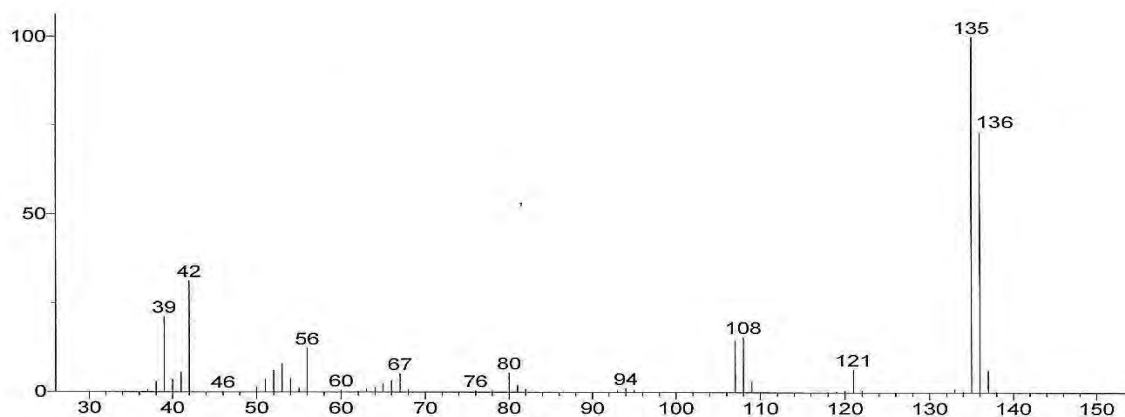


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

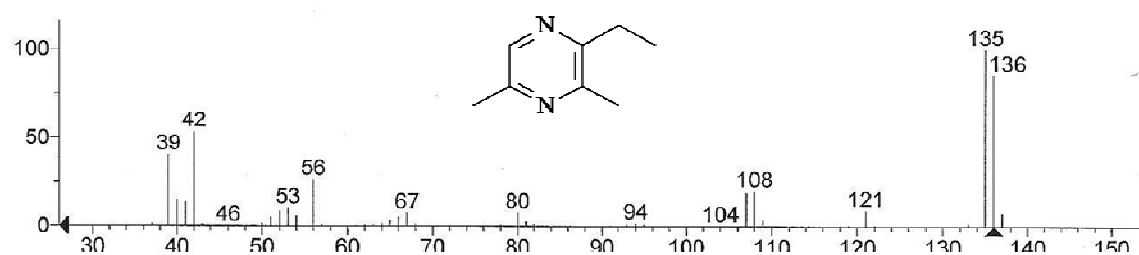


APÊNDICE C – Espectro de massas correspondente ao sinal (III) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula de veneno.

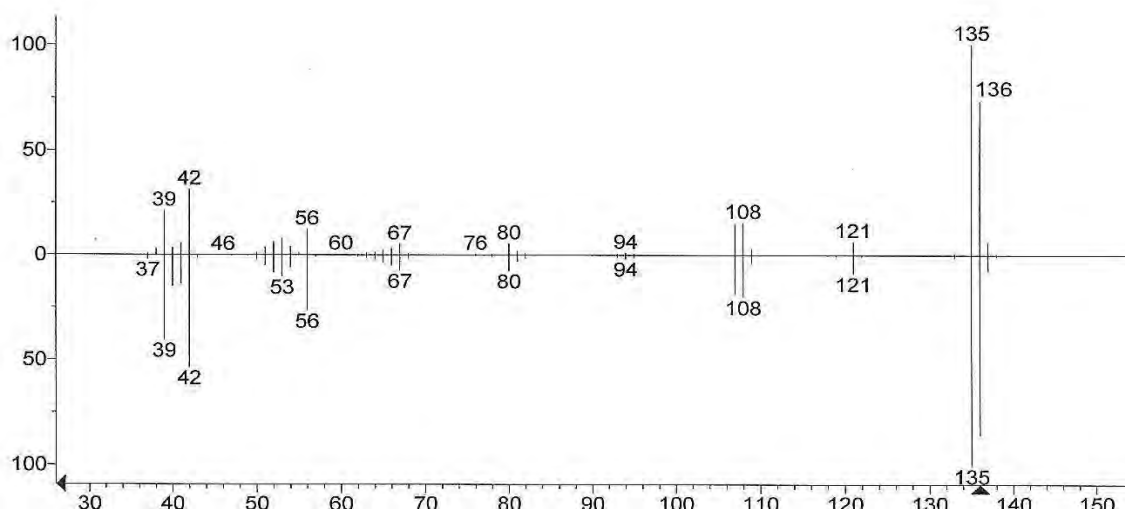
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

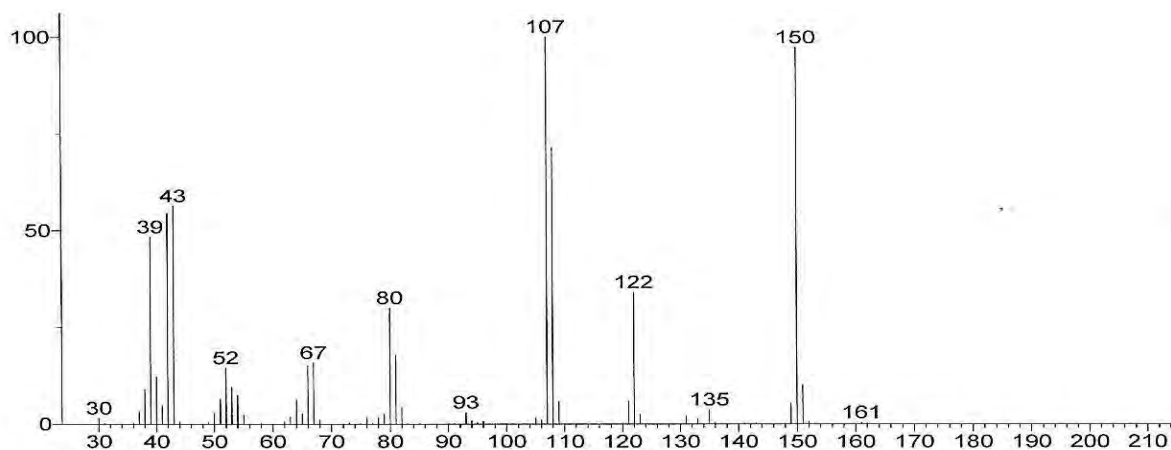


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

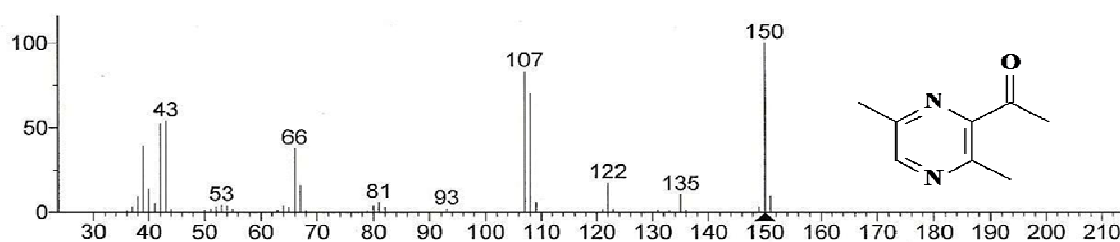


APÊNDICE D – Espectro de massas correspondente ao sinal (IV) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula de veneno.

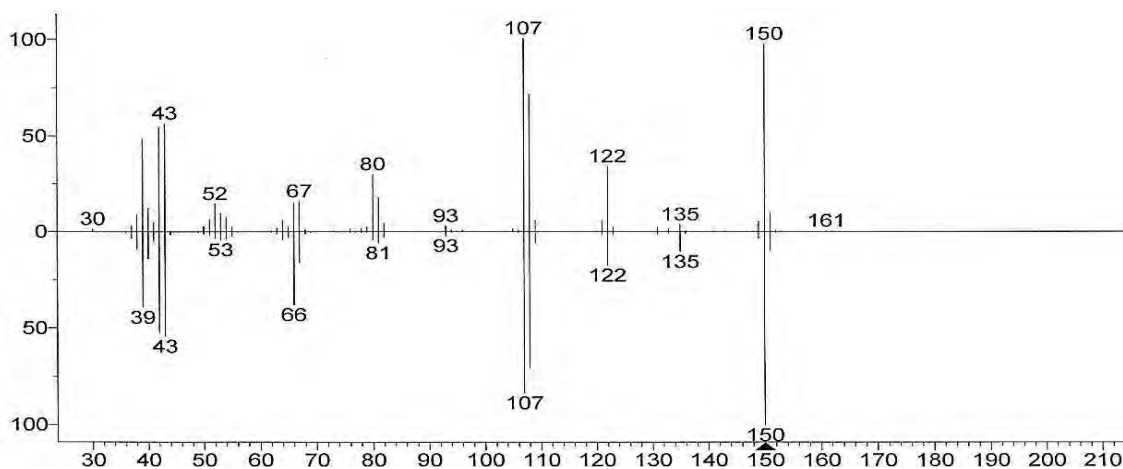
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

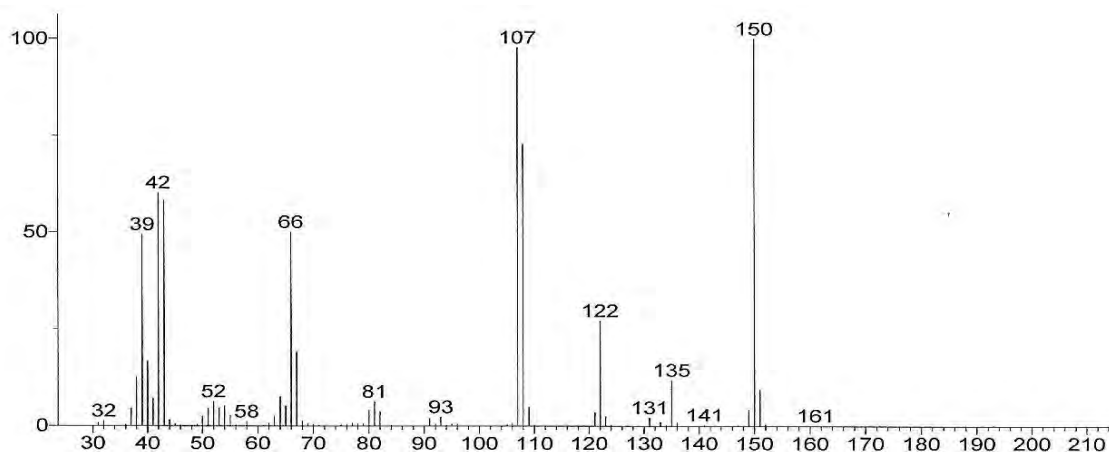


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

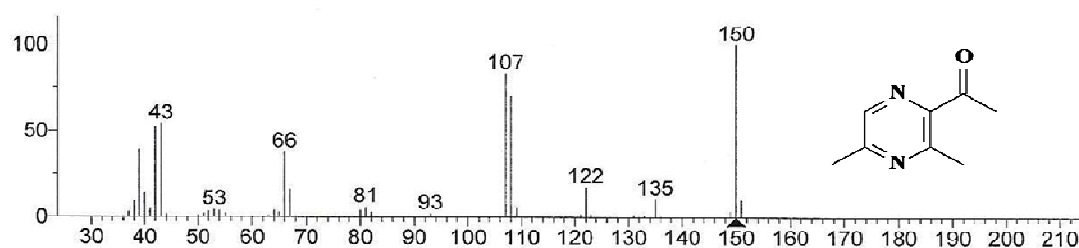


APÊNDICE E – Espectro de massas correspondente ao sinal (V) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula de veneno.

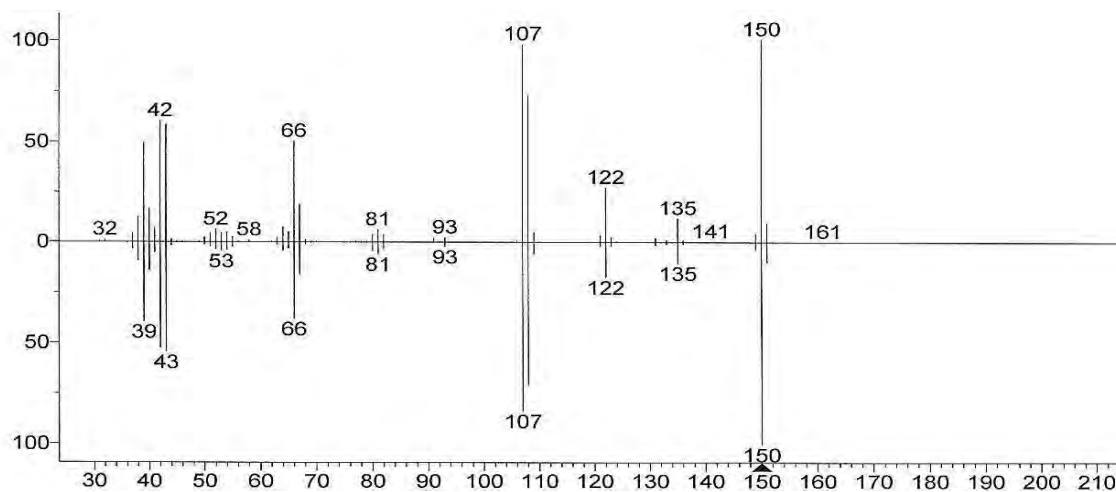
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

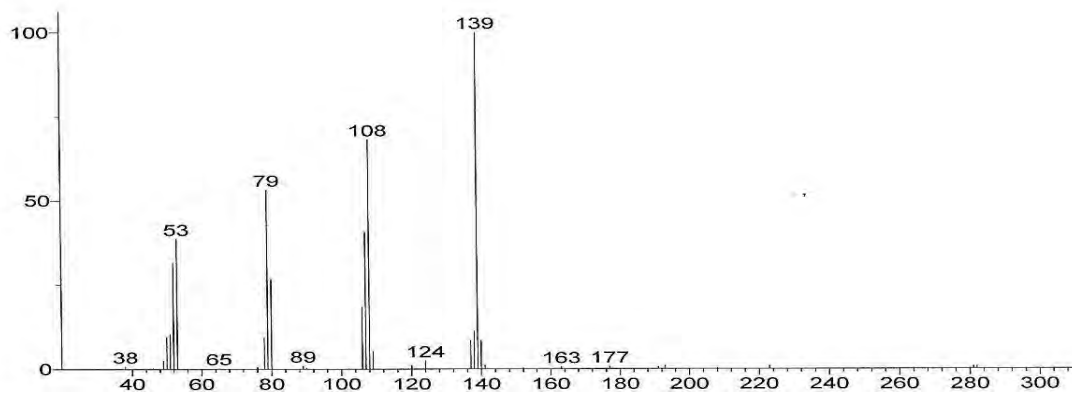


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

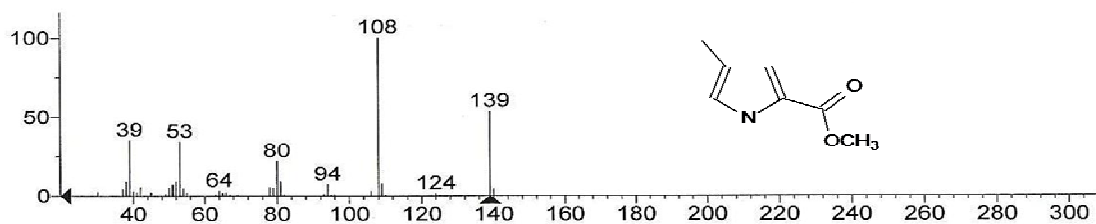


APÊNDICE F – Espectro de massas correspondente ao sinal (VI) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula de veneno.

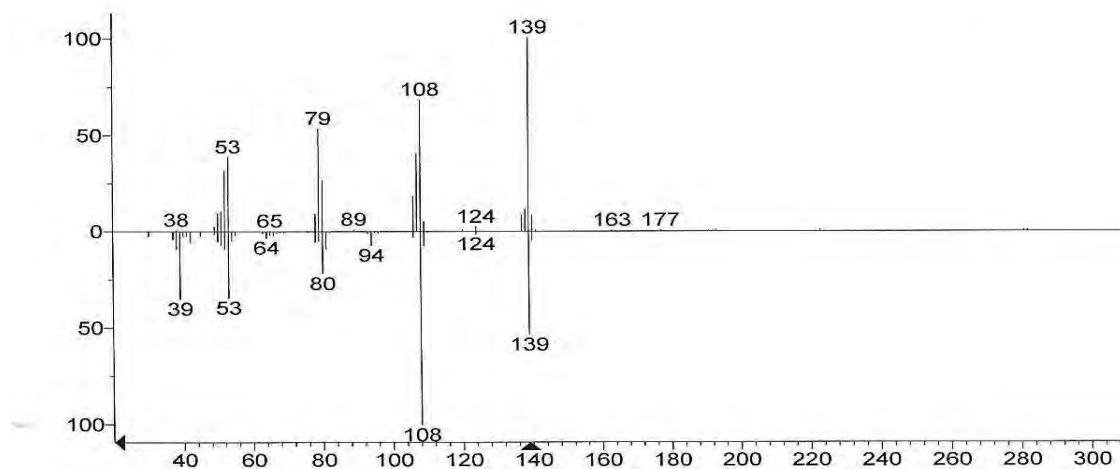
Espectro experimental



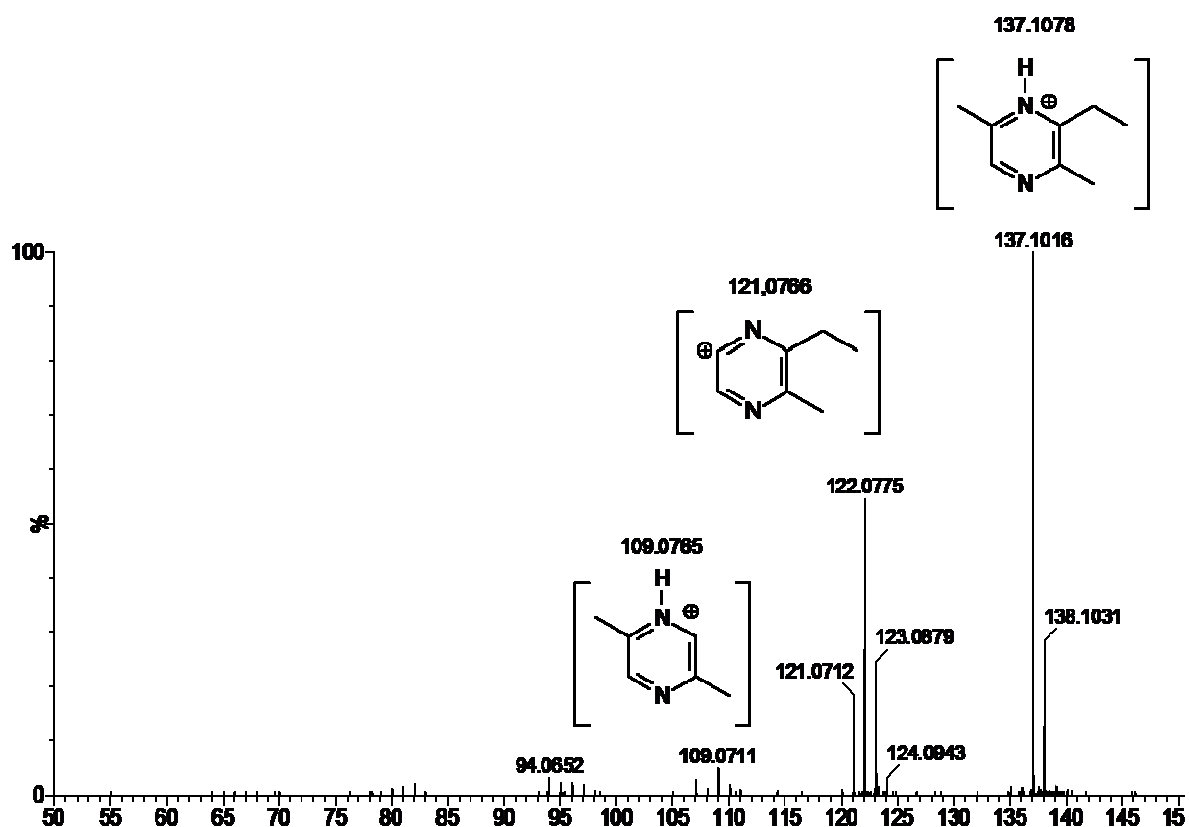
Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa



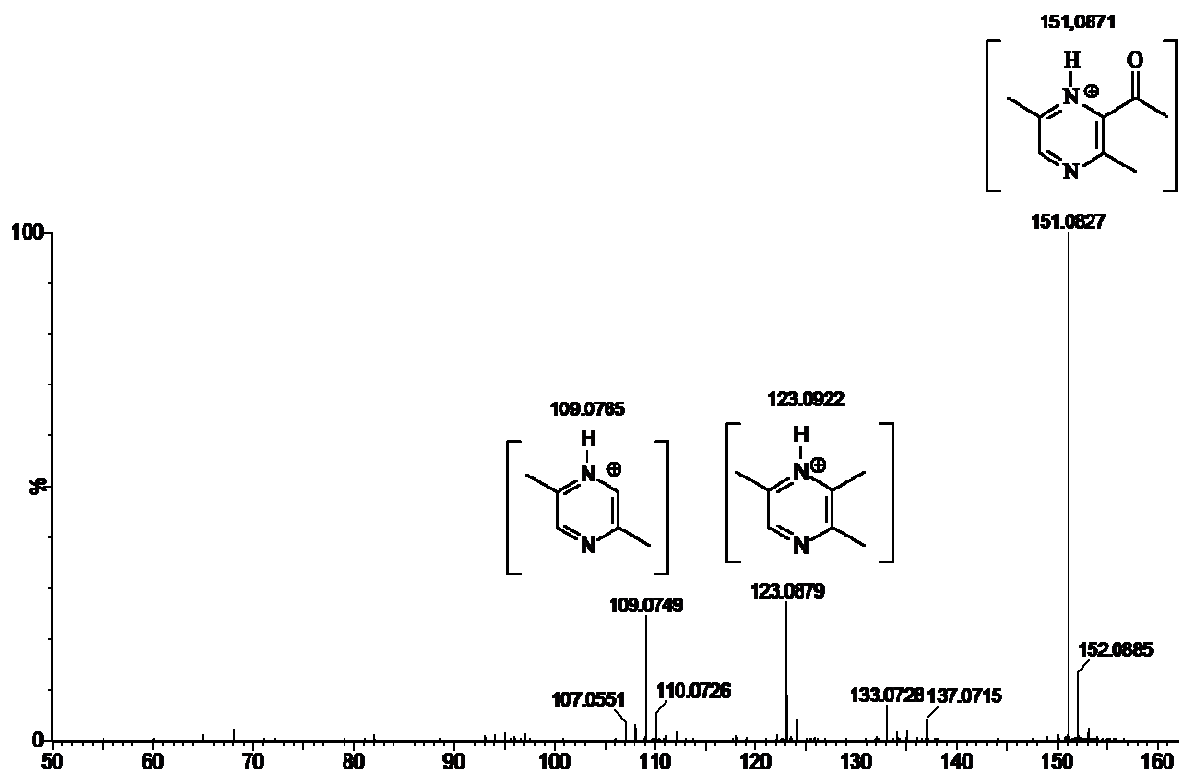
Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)



APÊNDICE G – Espectro de fragmentação do aduto de ESI-MS $[M + H]^+ = 137$, assim como as estruturas sugeridas para os fragmentos iônicos mais intensos.



APÊNDICE H – Espectro de fragmentação do aduto de ESI-MS $[M + H]^+ = 151$, assim como as estruturas sugeridas para os fragmentos iônicos mais intensos.



CAPÍTULO 3

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DA GLÂNDULA METAPLEURAL
de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

INTRODUÇÃO

O sucesso dos insetos sociais, como as formigas cortadeiras, mostra que a vida em sociedade apresenta vantagens em relação aos indivíduos solitários. Duas delas são a alocação de recursos e o cuidado com a prole, que tornam possível a manutenção de colônias numerosas. No entanto, este modo de vida não é benéfico no que diz respeito à propensão a doenças. Como principais fatores que tornam as colônias dispostas a parasitas, se destacam a densidade populacional e grau de parentesco elevados entre os indivíduos. Com relação ao número existem espécies de *Atta*, como a *Atta leavigata* por exemplo, que podem apresentar milhões de indivíduos na colônia (FOWLER *et alii*, 1986 e VEAL *et alii*, 1992).

Outro ponto importante a ser considerado é a proximidade genética. Em insetos sociais prevalece o altruísmo reprodutivo com base na reprodução sexual haplodiplóide. Tal fato passou a ser bem compreendido após a publicação de uma série de artigos pelo cientista William Hamilton (1964; 1970 e 1972). Esta teoria parte do princípio que o comportamento altruísta de um membro com o restante da colônia é ligado ao coeficiente de relacionamento (r) que este membro possui com a colônia. Hamilton mostrou que o coeficiente de parentesco estimado pelo sistema haplodiplóide tem um diferencial, pois os machos originam-se de óvulos não fertilizados. Assim, sendo somente a fêmea diplóide, originária de um óvulo fertilizado por um espermatozóide, o r calculado entre as irmãs operárias é de 0,75. Isto ocorre, pois ambas possuem cópias idênticas de genes procedentes do macho haplóide, mais uma das duas cópias possíveis da rainha que as originou. O r proveniente da reprodução entre macho e fêmea diplóides é de 0,5 entre irmãos, menor do que o observado para insetos sociais. Se as operárias fossem sexuadas o r calculado para a geração oriunda de uma nova reprodução seria de 0,375. Deixando claro que para a reprodução dos alelos é mais vantajoso investir em cuidado parental do que no desenvolvimento do aparelho reprodutivo funcional nas operárias.

Se aliarmos o que foi mencionado acima às condições de temperatura e umidade elevadas dentro das colônias, é pouco provável pensar em um ambiente melhor para a disseminação de agentes patogênicos (ANGUS *et alii*, 1993).

Contudo o êxito dos insetos sociais permanece, mostrando que eles encontraram uma forma de contornar esta dificuldade. A resposta está, principalmente, na produção de antibióticos (FERNÁNDEZ-MARÍN *et alii*, 2006). O uso destes proporcionou o desenvolvimento de um mecanismo de defesa muito eficiente ao longo da evolução, ajudando a controlar e/ou evitar infecções prejudiciais ao perfeito funcionamento da supersociedade.

Em formigas cortadeiras, os antibióticos podem ter origem da associação com outros microorganismos. Tal como as actinobactérias do gênero *Pseudonocardia* que colonizavam a cutícula de muitas espécies de *Acromyrmex* (CURRIE *et alii*, 1999). Esta bactéria produz antibióticos contra muitos agentes patogênicos que ocorrem nos substratos onde vivem estas formigas, principalmente contra os do gênero *Escovopsis* (HAEDER *et alii*, 2009). Contudo, a relação harmônica destas bactérias foi colada em dúvida por Sen *et alii* (2009).

Outra associação conhecida de formigas da tribo Attini ocorre com as leveduras negras, Ascomycota; *Phialophora* (LITTLE & CURRIE, 2007). Alguns gêneros são frequentemente encontrados nos ninhos de formigas cortadeiras (CARREIRO *et alii*, 1997; MIDDELHOVEN *et alii*, 2003; PAGNOCCA *et alii*, 2008 e LITTLE & CURRIE, 2008). O papel das leveduras ainda não é muito claro. Elas podem atuar de forma benéfica auxiliando no processo de digestivo, e/ou fornecendo proteção à colônia contra parasitas como: *Escovopsi*, *Syncephalastrum racemosum* e *Beauveria bassiana*. (RODRIGUES *et alii*, 2009). No entanto há trabalhos que relatam o efeito negativo destas leveduras, já que poderiam competir por nutrientes com a bactéria *Pseudonocardia*. Desta forma diminuiria a capacidade da bactéria suprimir o parasita *Escovopsis* (LITTLE & CURRIE, 2007).

Além das associações existe a produção de antibióticos por meio da secreção de uma glândula específica de formigas. Esta é a glândula metapleurar constituída por um par de conjuntos de células secretoras localizadas na região posterolateral do tórax (HOLLDÖBLER & ENGEL-SIEGEL, 1984). As secreções desta estão relacionadas com atividades antifúngica e antimicrobiana (SCHILDKNECHT, 1976 e NASCIMENTO *et alii*, 1996).

Nascimento *et alii* (1996) identificaram os ácidos fenilacético (3), 3-hidroxi-decanoico (4) e indol acético (5) na glândula de *Atta cephalotes*, e os ácidos 3-hidroxi-decanoico (4) e indol acético (5) em *Acromyrmex octospinosus*. Neste mesmo trabalho, os autores confirmam a atividade antibacteriana e antifúngica dos principais constituintes da glândula metapleural destas espécies. Recentemente, Ortius-Lechner *et alii* (2000) identificaram mais 20 compostos presentes na secreção da glândula metapleural de *Acromyrmex octospinosus*. A maioria deles são ácidos carboxílicos.

Os relatos bibliográficos mostram que a glândula metapleural tem importante papel na preservação da relação mutualística formiga/fungo. A maior parte dos trabalhos publicados está relacionada às espécies de *Atta*, sendo que apenas duas espécies de *Acromyrmex* tiveram a secreção analisada: *Acromyrmex landolti* (JAFFÉ *et alii*, 1994) e *Acromyrmex octospinosus* (NASCIMENTO *et alii*, 1996 e ORTIUS-LECHNER *et alii*, 2002). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato da glândula metapleural (EGM) da formiga *Acromyrmex subterraneus subterraneus* sob o crescimento “*in vitro*” de cinco microorganismos.

Os fungos testados no presente trabalho foram a *Beauveria bassiana* e a *Candida albicans*. O fungo *Beauveria* é uma espécie do gênero *Deuteromyceto*, típico dos solos de regiões temperadas. É conhecido como agente entomopatogênico de insetos de vida social e solitária (REHNER, 2005). Em virtude da virulência deste fungo muitos trabalhos relatam seu potencial uso no controle biológico de formigas cortadeiras (SILVA & DIEHL-FLEIG, 1988; DIEHL-FLEIG *et alii*, 1992 e 1993; SILVA *et alii*, 1993 e HUGHES *et alii*, 2004). Leveduras do gênero *Candida*, comumente presentes no solo, são encontradas com muita frequência nos ninhos de formigas cortadeiras, porém seu papel nos ninhos não foi esclarecido (CARREIRO *et alii*, 1997).

Bactérias gram-positivas e gram-negativas também já foram isoladas em colônias de formigas cortadeiras (BACCI *et alii*, 1995). Tal fato nos conduziu a avaliar o efeito EGM no crescimento de *Escherichia coli* e duas cepas de *Staphylococcus aureus*, uma de origem bovina (LSA 88) e outra resistente a meticilina (ATCC 33591).

Os fungos considerados neste estudo estão relacionados à interação formiga/fungo simbiote, fato que mostra a importância de conhecer qual o efeito que a secreção da glândula metapleurálica tem sobre eles. Além disso, todos os microorganismos testados estão envolvidos em diversos problemas infecciosos de humanos, animais e insetos (ALBRECHT *et alii*, 2006; CARREIRO *et alii*, 1997; BALABAN *et alii*, 2000; PERLROTH *et alii*, 2007 e AIRES-DE-SOUSA *et alii*, 2007).

MATERIAL E MÉTODOS

- Formigas

O bioensaio foi conduzido com formigas da espécie *Acromyrmex subterraneus subterraneus* mantidas na Unidade de Mirmecologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, localizada em Campos dos Goytacazes, RJ. Estas foram acondicionadas em salas com umidade e temperatura controladas e mantidas conforme descrição de Della Lucia *et alii* (1993). A alimentação diária de *A. subterraneus subterraneus* foi feita com folhas atrativas ao corte como acalifa (*Acalypha wilkesiana*) e/ou ligustro (*Ligustrum japonicum*).

- Obtenção dos extratos

Extratos de glândula metapleurálica (EGM) foram elaborados com 650 glândulas extraídas de operárias médias com cápsulas cefálicas entre 2,0 e 3,2 mm de largura. As glândulas foram depositadas em 650 μ L do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) usado na extração.

- Análise química dos extratos

Os constituintes do extrato foram analisados usando a técnica de cromatografia gasosa aliada à espectrometria de massas (CG-EM), e pela espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS).

As análises de CG-EM do extrato da glândula metapleural foram feitas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas AGILENT 6890N. Coluna DB-5 (30 m X 0,25 mm). O programa de temperatura foi o seguinte: injetor = 200 °C; detector = 260 °C; temperatura inicial da análise = 50 °C (por 1 min); temperatura final da análise = 260 °C (por 7 min) e taxa de aquecimento = 5 °C·min⁻¹ (tempo total de aquecimento = 42 min).

Nas análises por UPLC-ESI-MS/MS (Cromatografia Líquida de Ultra Performance- Ionização por Electrospray- Espectrometria de Massas Sequencial no Espaço), foi utilizado um cromatógrafo Waters nanoAcquity UPLC, acoplado diretamente à fonte de ESI do espectrômetro Waters Synapt HDMS. O cromatógrafo foi equipado com uma coluna Waters Atlantis dC₁₈ (300 µm diâmetro interno x 150 mm comprimento, partículas de 3 µm), mantida a 35°C durante as corridas. As amostras foram diluídas em H₂O e injetadas (1 a 5 µL), sendo eluídas com gradientes lineares de 95:5 H₂O/MeCN contendo 0,1% ácido fórmico a 5:95% H₂O/MeCN contendo 0,1% ácido fórmico, a um fluxo de 16 µL min⁻¹.

Dentre condições fixas do espectrômetro de massas estão voltagem do capilar 3,0 kV e voltagem do cone 20 V. Durante cada corrida, espectros de MS e MS/MS foram adquiridos a uma taxa de 1 espectro s⁻¹ no modo DDA. Nesse modo, o instrumento adquire espectros de MS constantemente durante a corrida. Quando um determinado espectro de MS contém sinais de compostos de interesse para experimentos de MS/MS, o instrumento ajusta o quadrupolo para selecionar íons daquela razão *m/z* e os fragmenta, adquirindo espectros de MS/MS, e retorna à função MS em seguida. As análises foram feitas nos modos negativo, ESI(-)MS, e positivo, ESI(+)MS. Para ESI(-)MS foram adicionados 1 µL de ácido fórmico. E para ESI(-)MS adicionaram-se 1 µL de hidróxido de amônio. Os espectros de massa foram adquiridos na faixa de massa/carga (*m/z*) de 40 até 700.

- Microorganismos

Os microorganismos testados neste experimento foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), *Staphylococcus aureus* (LSA 88) de origem bovina, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 20231) e *Beauveria bassiana* (CG 24). Todos os inóculos dos microorganismos foram preparados em solução salina estéril com aproximadamente 10^6 células/mL. A concentração foi determinada por leitura de densidade óptica $D.O_{.510nm}$ com o uso de Densimat (Biomérieux, França). As leituras foram estabelecidas 0,5 na escala de McFarland que equivale a 10^6 células/mL.

- Montagem do bioensaio

O bioensaio foi realizado em triplicata, com o uso de ampolas de 10 mL. O meio para o crescimento dos inóculos foi o caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), meio líquido nutritivo destinado ao cultivo de muitos microorganismos (GIBSON & ROBERTS, 1986 e BURTELOW *et alii*, 2009). Um esquema representativo pode ser observado na Figura 3.1.



Figura 3.1 – Representação esquemática da montagem do bioensaio em *Candida albicans*; para cada tratamento foram feitas três repetições (ensaio em triplicata).

Os tratamentos controle positivo, EGM e controle negativo (controle DMSO) foram formulados do seguinte modo:

- Controle positivo: 1900 μL de caldo BHI estéril + 100 μL do inóculo a ser testado
- EGM - 1850 μL de caldo BHI estéril + 100 μL do inóculo a ser testado + 50 μL EGM
- Controle negativo (controle DMSO) - 1850 μL de caldo BHI estéril + 100 μL do inóculo a ser testado + 50 μL solvente usado na extração DMSO.

Todos os tratamentos receberam 100 μL do inóculo. O que variou foi o volume do caldo BHI. Assim, todas as nove ampolas do bioensaio apresentaram um volume final de 2000 μL (2mL).

A condição experimental do bioensaio foi diferente para fungos e bactérias. Para o crescimento de *B. bassiana* a temperatura de incubação foi de 28°C e os cultivos foram monitorados por 64h. As medições da densidade óptica foram realizadas em intervalos de 4h. Para *C. albicans* a temperatura de incubação foi de 37°C e os cultivos foram monitorados por 21h. As medições foram feitas em intervalos de 2h. Todos os cultivos das bactérias foram submetidos às mesmas condições experimentais, sendo incubados em estufa a 37°C e monitorados por 6h, com medições de densidade óptica (D.O.) a cada 1h. O tempo de monitoramento para os fungos e bactérias foi o necessário para que o tratamento controle positivo atingisse a medida máxima de 7,5 na escala McFarland (D.O._{510nm}, Densimat, Biomérieux, França).

A densidade óptica é a avaliação da turbidez, relacionada ao crescimento celular, da cultura microbiana em meio líquido. O fotômetro mede a transmitância da luz que incide no meio de cultivo microbiano. A escala de Mc Farland é o padrão de turbidez mais utilizado frequentemente nos laboratórios de microbiologia, para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos. O limite máximo da escala é de 7,5 McFarland, este diz respeito ao número máximo de microorganismos que se opõe a livre passagem da luz, provocando a turvação do meio, que pode ser lido pelo fotômetro.

- Análise estatística

O efeito do EGM sobre o crescimento “*in vitro*” dos microorganismos foi avaliado por curvas de regressão polinomial.

Também efetuou-se a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey da média dos valores de D.O que estão relacionadas ao crescimento dos inóculos testados para todos os tratamentos. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes para $p \leq 0,01$. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Origin Lab 8.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O EGM apresentou atividade inibitória no crescimento de todos os organismos testados. A atividade antifúngica mais marcante foi contra o fungo *B. bassiana*. Como este é um agente patogênico das formigas cortadeira, os resultados revelam a importância da secreção da glândula na manutenção das condições assépticas da colônia, Figura 3.2.

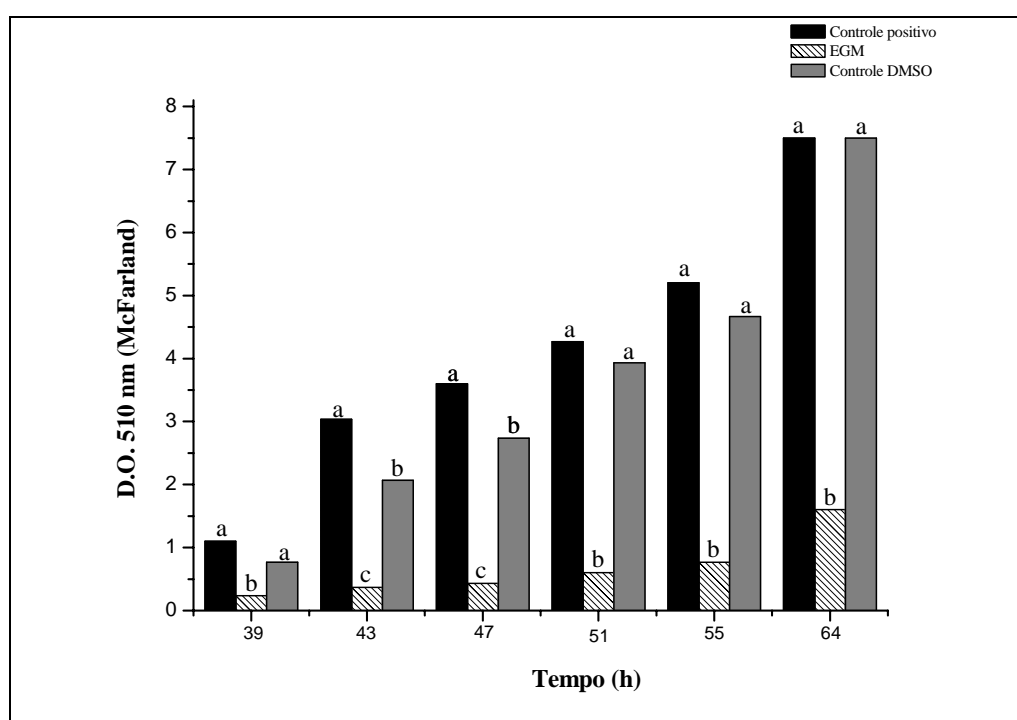


Figura 3.2 - Efeito do extrato da glândula metapleural sobre *Beauveria bassiana* (CG 24) em cultivo “*in vitro*” às 39, 43, 47, 51, 55 e 64 horas (a 28°C) × Densidade Óptica 510nm. As diferenças estatísticas de médias foram obtidas pelo teste de Tukey em nível de 1% de probabilidade. Letras distintas indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,01$).

A curva de regressão polinomial das médias também deixa claro a forte capacidade inibitória do EGM frente a *B. bassiana*, Figura 3.3.

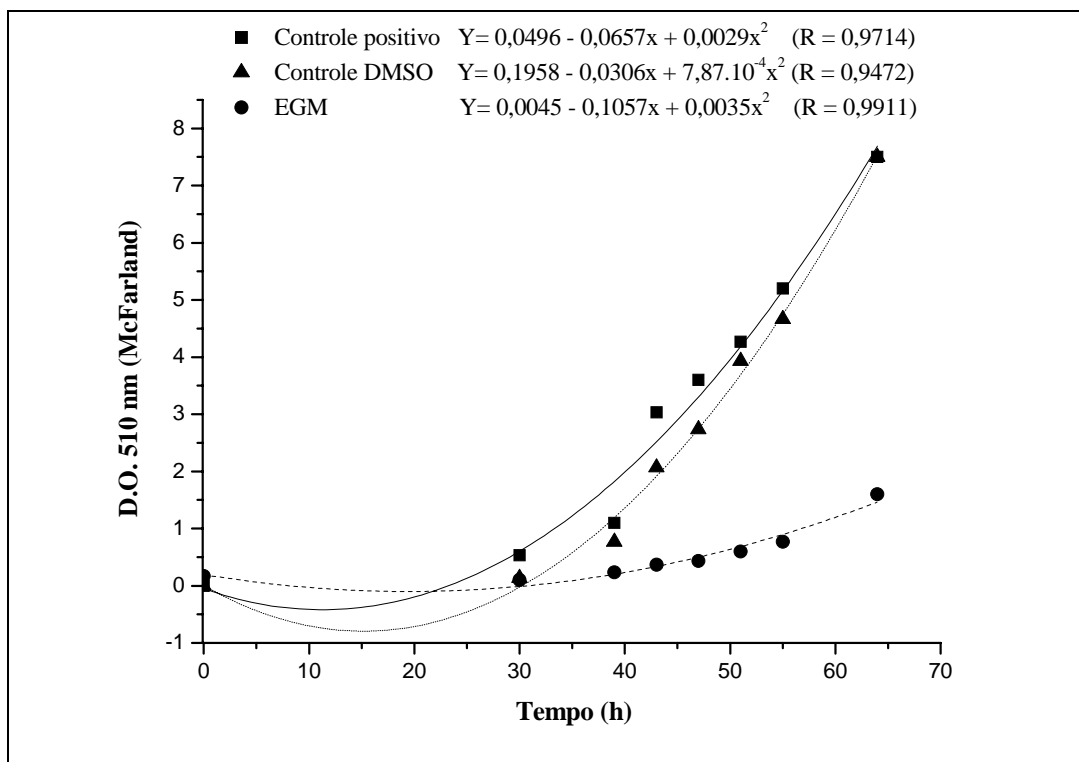


Figura 3.3 - Curva de regressão polinomial da atividade do extrato da glândula metapleurais sobre o crescimento de *Beauveria bassiana* (CG 24) “*in vitro*”, expressada pela relação Tempo de incubação × Densidade Óptica 510nm.

O efeito fungicida para *B. bassiana* foi mensurado pelo acompanhamento do crescimento com análise de regressão e teste de Tukey para diferenciação das médias (Figuras 3.2 e 3.3). Em virtude destes bons resultados, também foi empregada a metodologia diluições seriadas em caldo e inoculadas em ágar *Sabouraud* para a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). Com esta observação é possível comparar a proporcionalidade de crescimento de UFCs entre as diluições dos tratamentos em meio sólido (CARTER, 1988).

A Figura 3.4 demonstra por UFCs a supressão do crescimento de *B. bassiana* no ensaio realizado “*in vitro*” nas diluições de 1×10^{-1} , 1×10^{-2} e 1×10^{-3} .

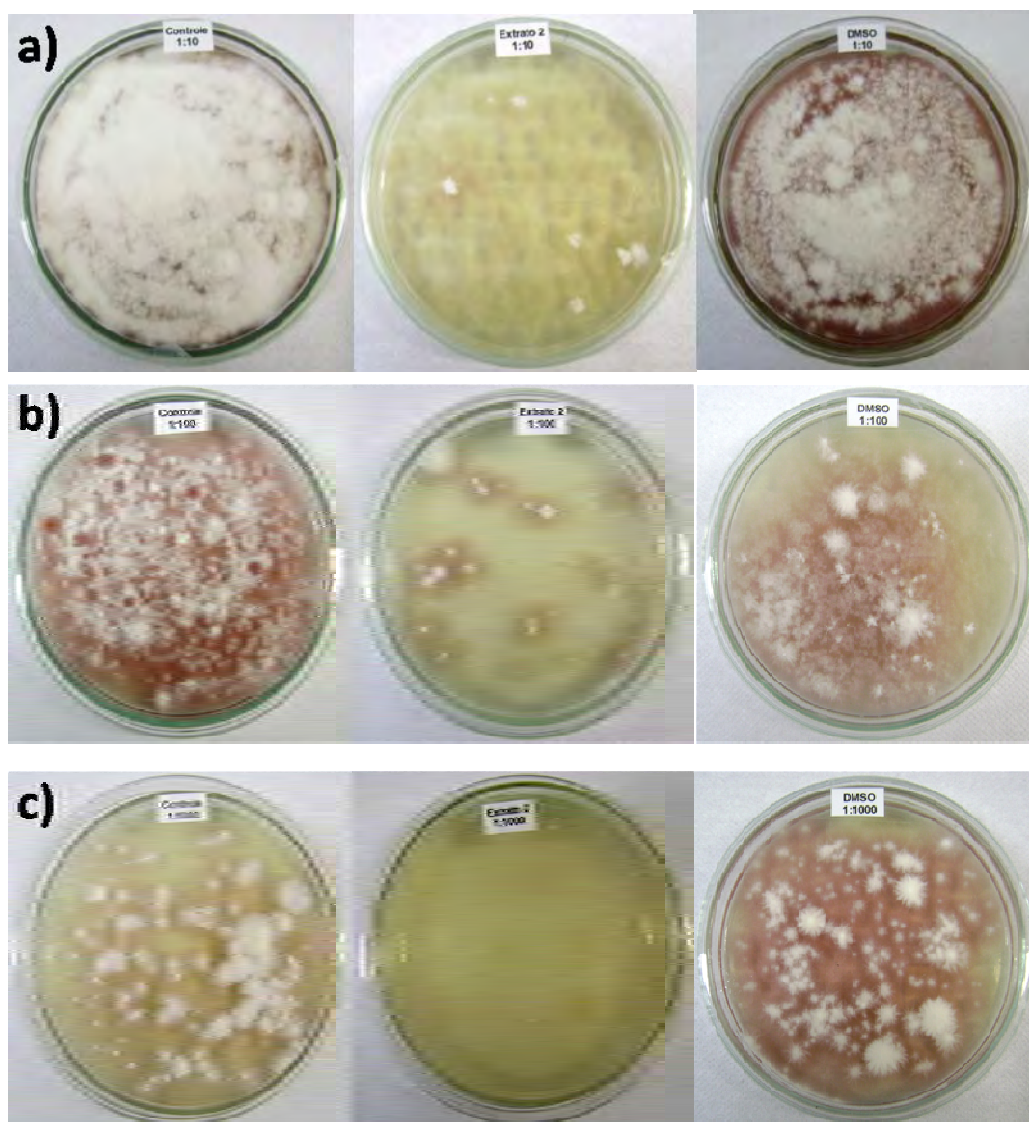


Figura 3.4 - Ensaio de contagem de Unidades Formadoras de Colônias de *Beauveria bassiana* pela metodologia de diluições. a) Comparações entre os tratamentos na diluição 1×10^{-1} ; b) Comparações entre os tratamentos na diluição 1×10^{-2} e c) Comparações entre os tratamentos na diluição 1×10^{-3} .

A atividade inibitória no crescimento de *B. bassiana* causada pelo EGM advém da significativa redução da formação de conídios do fungo, Figura 3.5. Esta atividade já foi relacionada à hidroxiácidos, compostos que estão presentes no EGM (NASCIMENTO *et alii*, 1996 e BOT *et alii*, 2002).

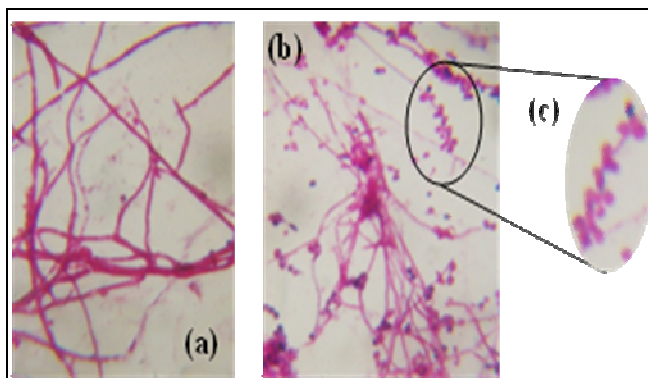


Figura 3.5 – Microscopia óptica de uma lâmina com hifas de *Beauveria bassiana*, aumento 1000 ×, de amostras tratadas com extrato da glândula metapleurá (a); e seu controle (b); e ampliação dos conídios (c) que estão ausentes no tratamento (a).

Os resultados do bioensaio também demonstram acentuada atividade para *C. albicans*, Figura 3.6. A diferença estatística das médias começou a ser observada após 15h de incubação.

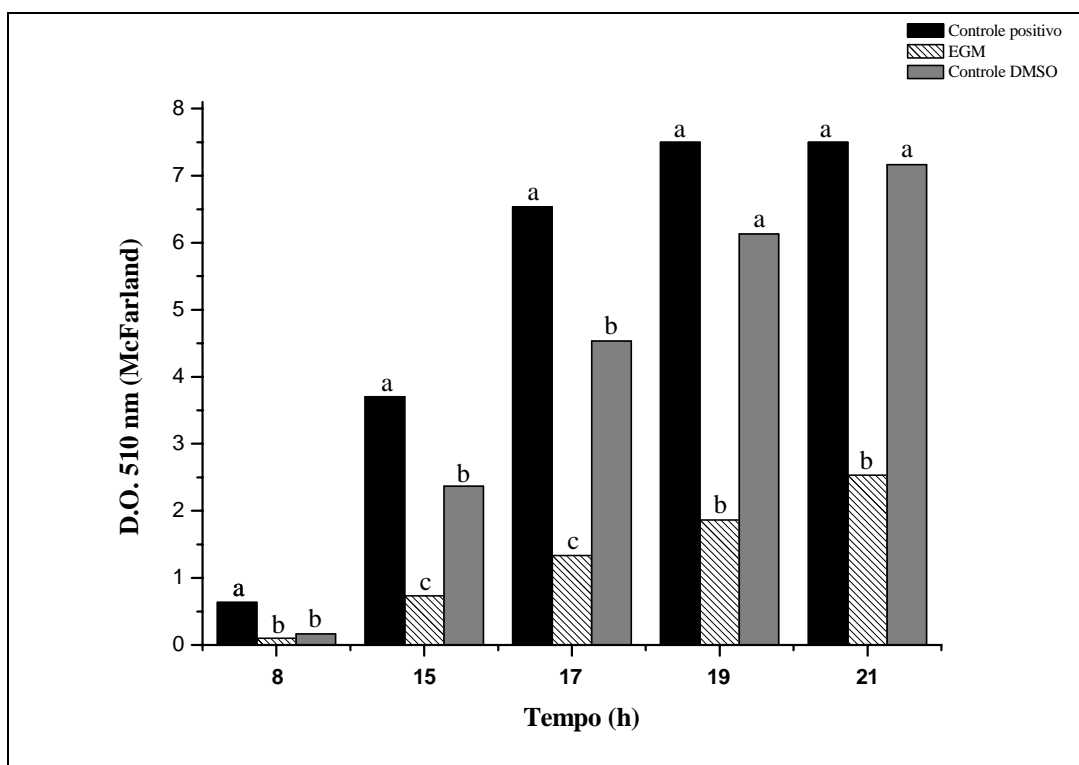


Figura 3.6 - Efeito do extrato da glândula metapleural sobre *Candida albicans* (ATCC 20231) em cultivo “*in vitro*” às 8, 15, 17, 19 e 21 horas (a 37°C) × Densidade Óptica 510nm. As diferenças estatísticas de médias foram obtidas pelo teste de Tukey em nível de 1% de probabilidade. Letras distintas indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,01$).

A regressão polinomial, Figura 3.7, ainda evidencia o efeito positivo do EGM sobre a inibição do crescimento de *C. albicans*. Não houve diferença entre o controle positivo e controle DMSO, ficando claro que o solvente não interferiu no crescimento do fungo.

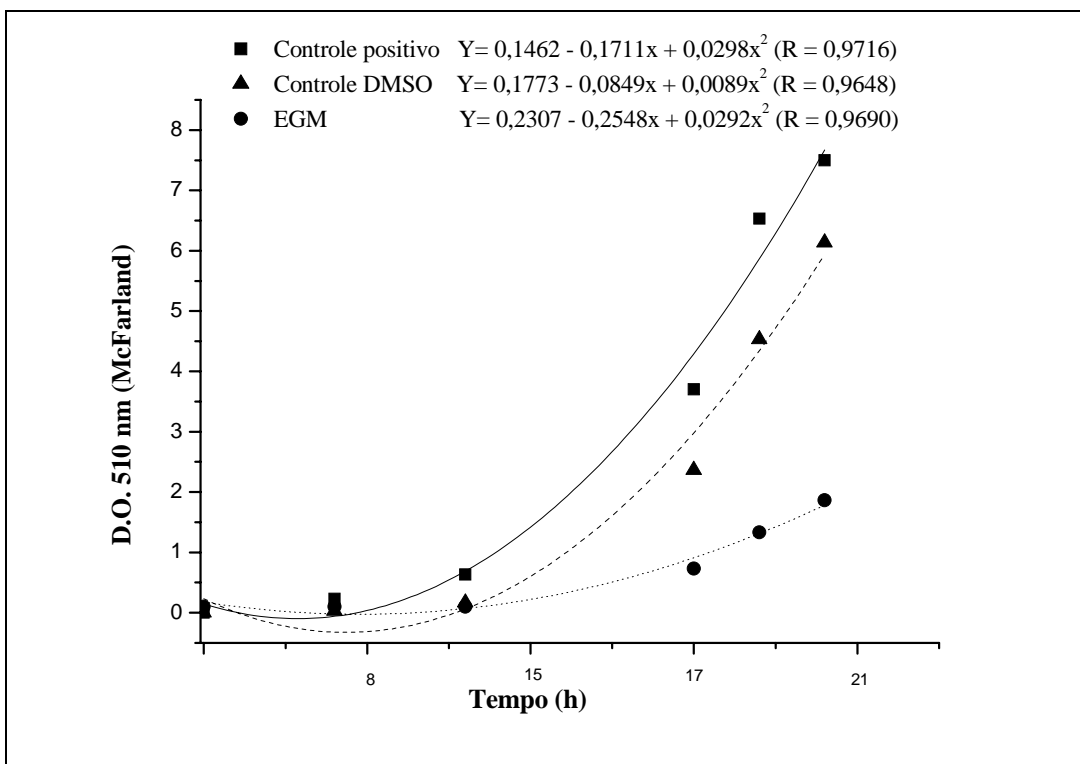


Figura 3.7 - Curva de regressão polinomial da atividade do extrato da glândula metapleurais sobre o crescimento de *Candida albicans* (ATCC 20231) "in vitro", expressada pela relação Tempo de incubação × Densidade Óptica 510nm.

Por meio das diluições constatou-se o efeito inibitório pela diferença UFCs entre os tratamentos. Esta foi notada nas diluições de 1×10^{-1} , Figura 3.8.

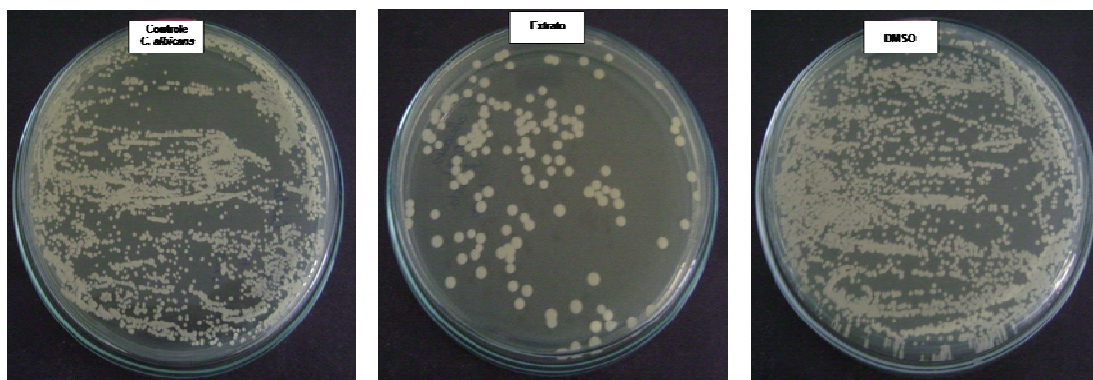


Figura 3.8 - Ensaio de contagem de Unidade Formadoras de Colônias de *Candida albicans* pela metodologia de diluições. Comparações entre os tratamentos na diluição 1×10^{-1} .

A presença de leveduras de *C. albicans* nos ninhos de formigas cortadeiras tem função desconhecida (CARREIRO *et alii*, 1997 e RODRIGUES *et alii*, 2008). Como a *Candida* é um fungo tipicamente encontrado nos solos, é plausível que a secreção da glândula metapleurar impeça o crescimento deste dentro das colônias a níveis que sejam prejudiciais.

Com relação às bactérias testadas, o EGM causou o retardamento no crescimento das cepas. Ou seja, foi possível observar um efeito estático e não inibitório.

O efeito menos expressivo foi observado na cepa ATCC 33591 de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). A diferença estatística entre os controles e o EGM só foi observado após 5h de incubação onde todos os tratamentos diferiam estatisticamente, Figura 3.9. Nas médias de densidade óptica obtidas às 6h não é observada diferença entre os controles enquanto o tratamento EGM é estatisticamente diferente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

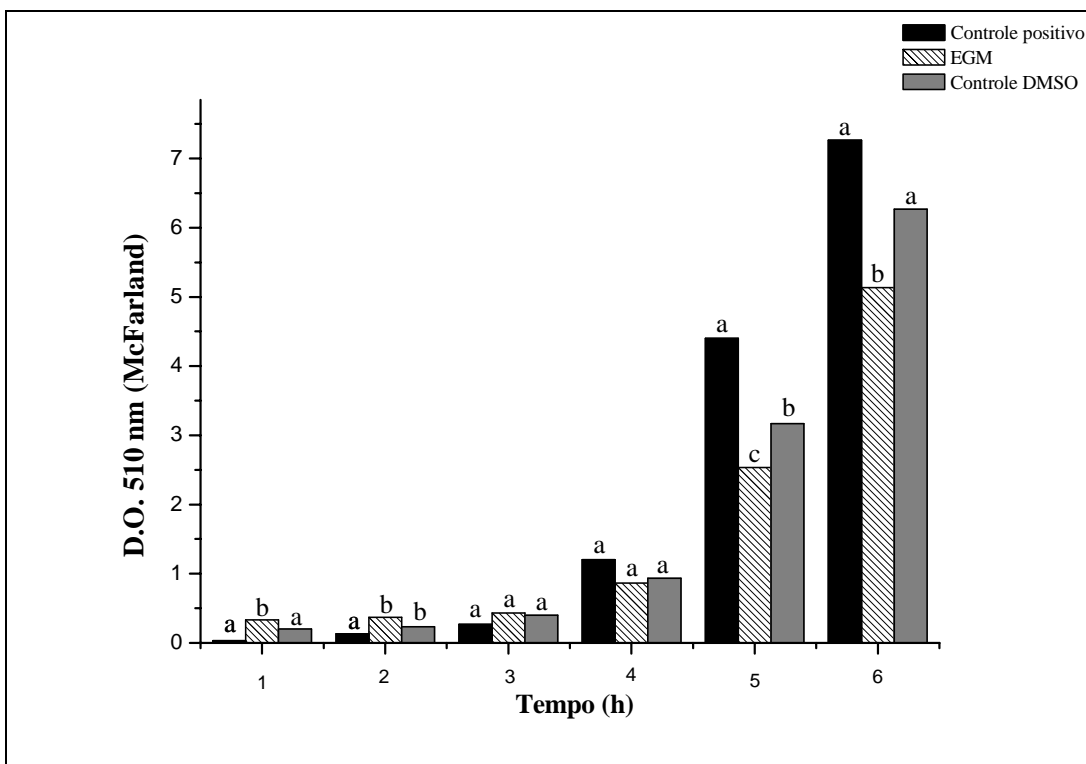


Figura 3.9 - Efeito do extrato da glândula metapleural sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 3359) em cultivo “*in vitro*” às 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas (a 37°C) × Densidade Óptica 510nm. As diferenças estatísticas de médias foram obtidas pelo teste de Tukey em nível de 1% de probabilidade. Letras distintas indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,01$).

A curva de regressão polinomial, Figura 3.10, expressa a relação entre o tempo de incubação × Densidade Óptica 510nm. Como mostrado a curva obedece ao modelo proposto para análise.

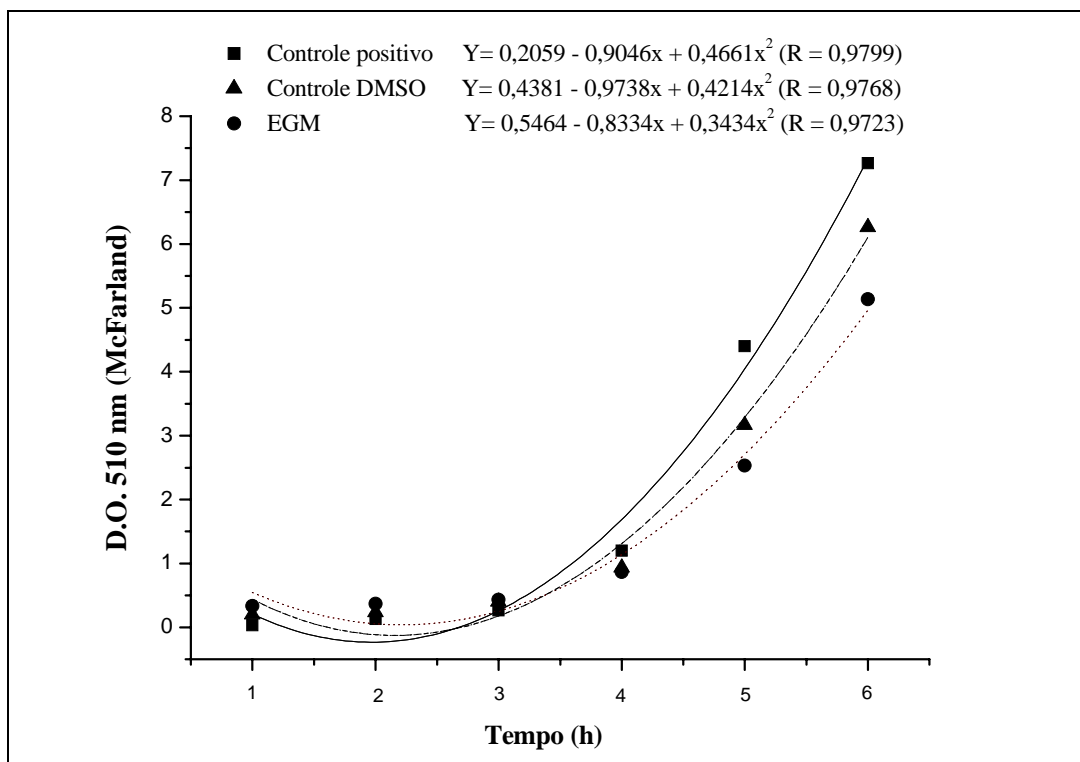


Figura 3.10 - Curva de regressão polinomial da atividade do extrato da glândula metapleural sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 3359) “*in vitro*”, expressada pela relação Tempo de incubação × Densidade Óptica 510nm.

O pior resultado observado para a cepa de *S. aureus* ATCC 3359 pode ser decorrente do alto aferro desta bactéria, que constitui uma estirpe resistente à meticilina (SARM). O *S. aureus* SARM é responsável por mais da metade das infecções hospitalares no sul da Europa e Estados Unidos (PESAVENTO *et alii*, 2007 e POMBA *et alii*, 2009). A bactéria adquiriu resistência a penicilina, estreptomicina, tetraciclina e eritromicina, entre os anos de 1943 a 1960. Posteriormente passou a resistir também a meticilina, em apenas um ano do seu uso terapêutico. E desta forma tornou-se imune a todos os antibióticos da classe beta-lactâmicos, onde se inclui a penicilina, a amoxicilina ou a oxacilina. Em virtude crescente da dificuldade de combater o *S. aureus* resistente a meticilina, o mesmo é chamado de superbactéria já que resiste a praticamente todos os antibióticos produzidos nos últimos 50 anos (CUNY *et alii*, 2009 e MOORE *et alii*, 2009).

A cepa de *S. aureus* (LSA 88) de origem animal mostrou-se mais sensível ao EGM. As diferenças de médias de densidade óptica foram notadas a partir de 4h de incubação, Figura 3.11.

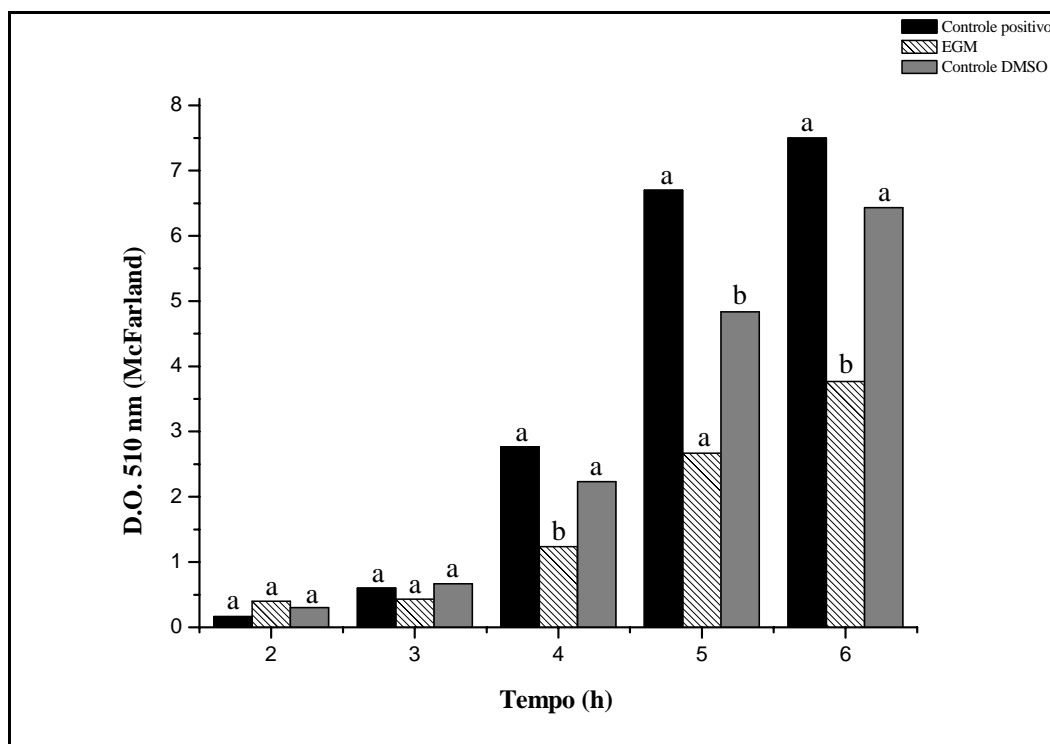


Figura 3.11 - Efeito do extrato da glândula metapleurar sobre *Staphylococcus aureus* (LSA 88) em cultivo “*in vitro*” às 2, 3, 4, 5 e 6 horas (a 37°C) × Densidade Óptica 510nm. As diferenças estatísticas de médias foram obtidas pelo teste de Tukey em nível de 1% de probabilidade. Letras distintas indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,01$).

O modelo de regressão polinomial também indica que o EGM suprime o crescimento da bactéria de modo significativo. Além disto, este crescimento foi pouco afetado pelo solvente DMSO, Figura 3.12.

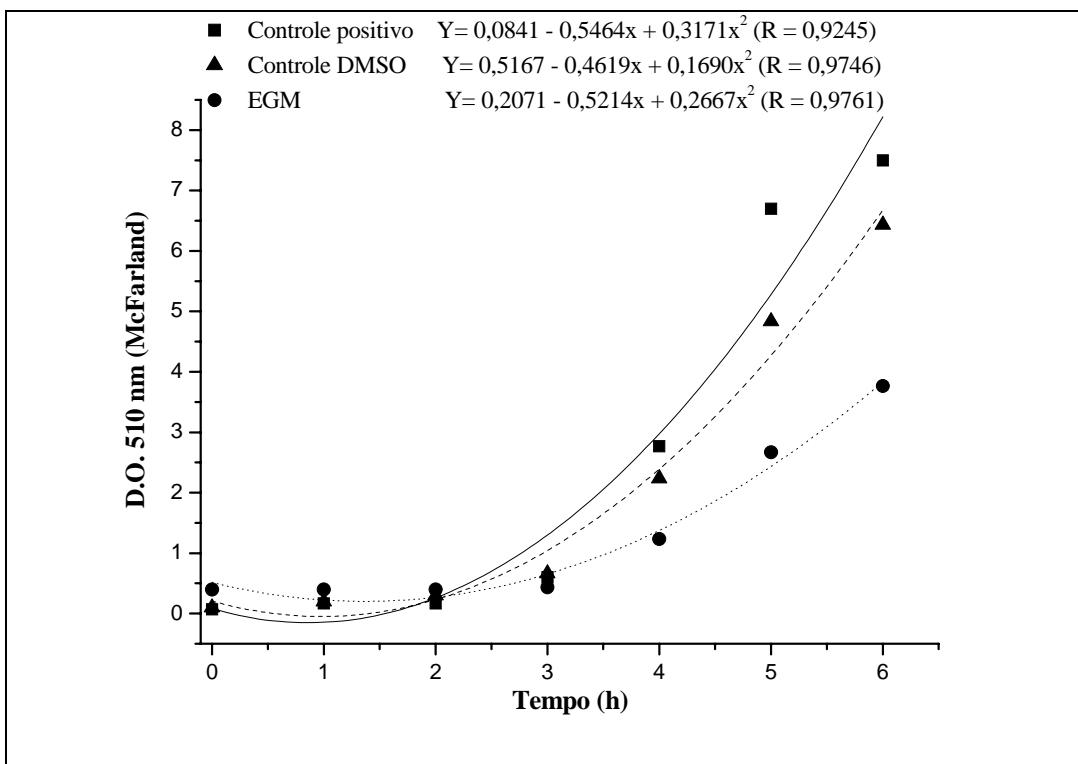


Figura 3.12 - Curva de regressão polinomial da atividade do extrato da glândula metapleurar sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* (LSA 88) “*in vitro*”, expressada pela relação Tempo de incubação × Densidade Óptica 510nm.

No caso de *Escherichia coli* a partir 3h de incubação, todos os tratamentos apresentaram diferença estatística significativa, Figura 3.13.

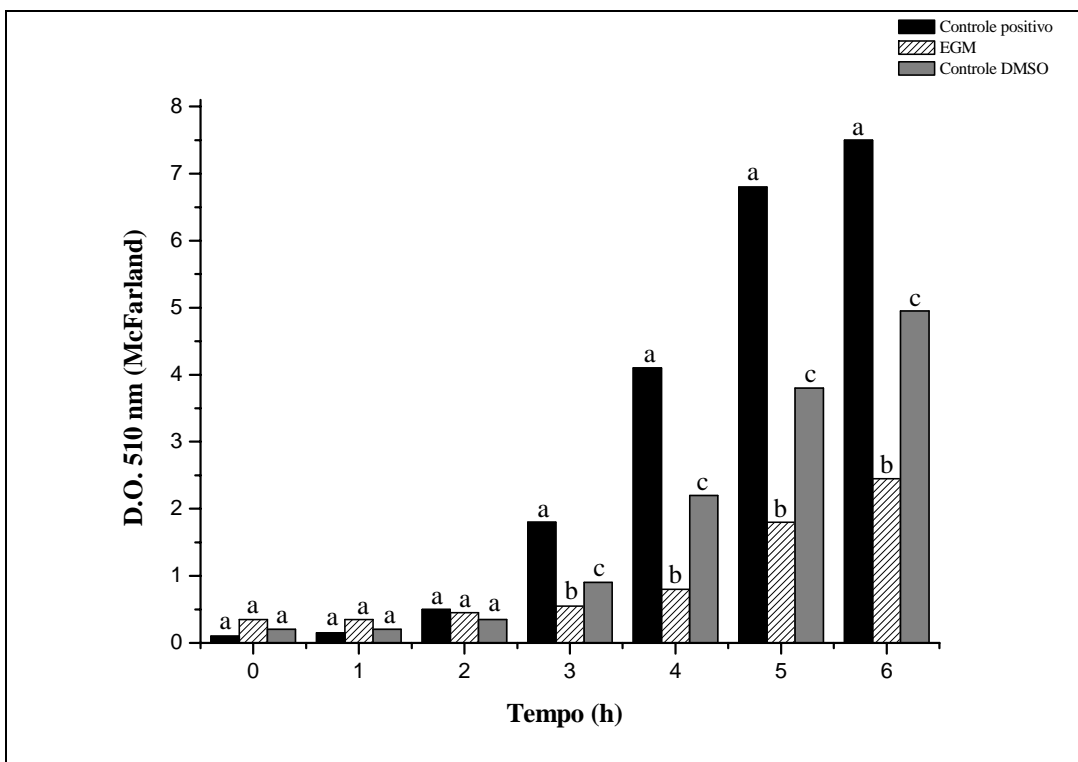


Figura 3.13 - Efeito do extrato da glândula metapleural sobre *Escherichia coli* (ATCC 25922) em cultivo “*in vitro*” às 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas (a 37°C) × Densidade Óptica 510nm. As diferenças estatísticas de médias foram obtidas pelo teste de Tukey em nível de 1% de probabilidade. Letras distintas indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,01$).

Apesar do efeito inibitório do EGM, este efeito também foi notado no controle DMSO que ocasionou a supressão do crescimento bacteriano, Figura 3.14.

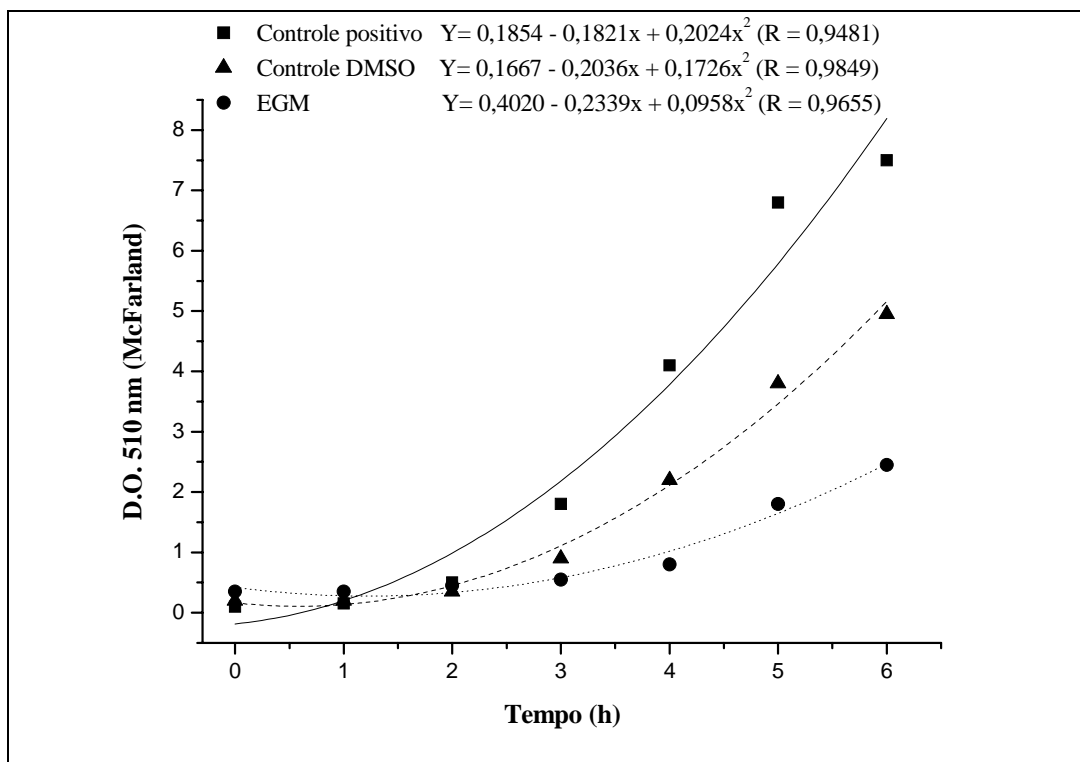


Figura 3.14 - Curva de regressão polinomial da atividade do extrato da glândula metapleural sobre o crescimento de *Escherichia coli* (ATCC 25922) "in vitro", expressada pela relação Tempo de incubação × Densidade Óptica 510nm.

A influência do solvente no bioensaio de *E. coli* pode ser explicada no fato de que o DMSO funciona como um aceptor de elétrons. É possível o que no momento de incubação, a bactéria em stress, tenha usado o DMSO redutase e desta forma empregado o DMSO como substrato para crescer (RAY *et alii*, 2003).

Os espectros de CG-EM mostram indícios de cetonas, heteroaromáticos, éteres, cetoésteres e ácidos como principais constituintes. O cromatograma de íons totais traz os sinais dos principais compostos detectados, Figura 3.15.

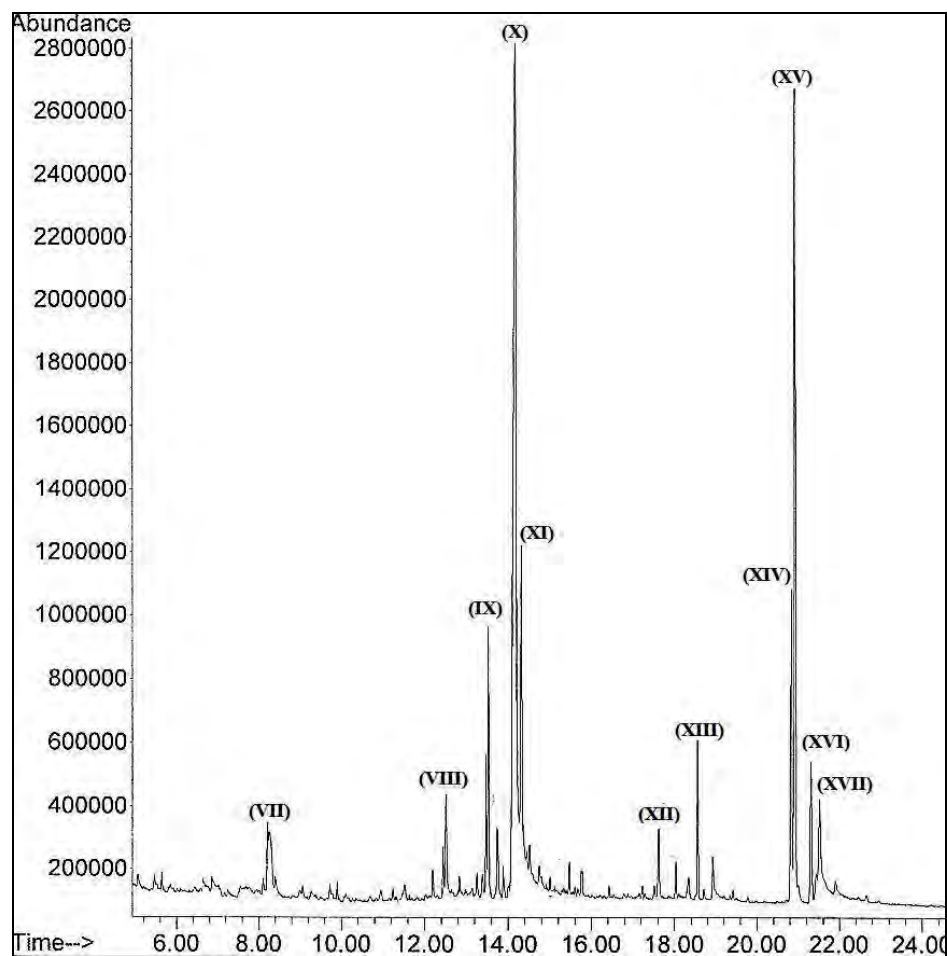


Figura 3.15 – Cromatograma total de íons obtido pela técnica de cromatografia gasosa aliada à espectroscopia de massas para o extrato da glândula metapleural, com indicação dos sinais cujas estruturas foram sugeridas.

Os espectros de fragmentação dos sinais mais intensos estão em anexo. A Tabela 3.1 mostra o tempo de retenção destes sinais e o anexo correspondente destes.

Tabela 3.1 – Sinais presentes no espectro de massas do extrato da glândula metapleural, com os respectivos tempos de retenção e anexo correspondente.

| Sinal | Tempo de retenção (min) | Anexos |
|-------|-------------------------|------------|
| VII | 8,2050 | Apêndice I |
| VIII | 12,520 | Apêndice J |
| IX | 13,471 | Apêndice K |
| X | 14,189 | Apêndice L |
| XI | 14,318 | Apêndice M |
| XII | 17,604 | Apêndice N |
| XIII | 18,924 | Apêndice O |
| XIV | 20,832 | Apêndice P |
| XV | 20,916 | Apêndice Q |
| XVI | 21,311 | Apêndice R |
| XVII | 21,518 | Apêndice S |

A Figura 3.16 mostra o cromatograma gerado na análise do EGM por meio da ionização por *electrospray*.



Figura 3.16 - Análise cromatográfica do extrato da glândula metapleural pela ionização por *electrospray*.

A estrutura de alguns dos compostos identificados na glândula metapleural de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* podem ser vistos na Figura 3.17.

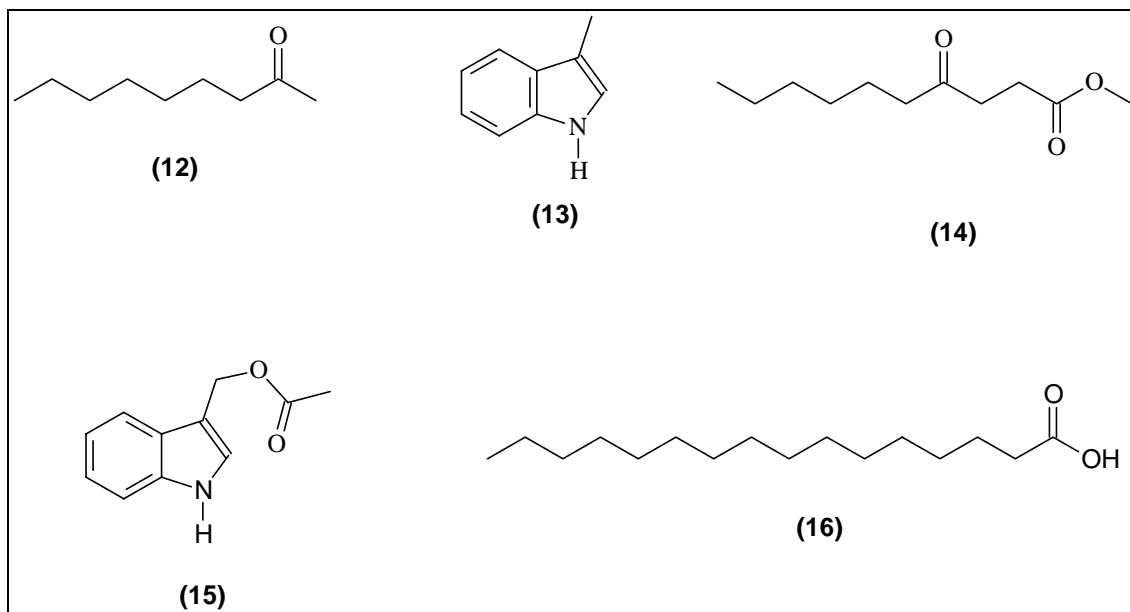


Figura 3.17 - Estruturas sugeridas pela biblioteca do programa como alguns dos constituintes do extrato da glândula metapleural.

A correlação entre as estruturas propostas são suportadas por mecanismos de fragmentação coerentes, ou por concordância com fragmentogramas tabelados dos respectivos padrões (ADAMS, 1995).

O fragmentograma da 2-nonanona (**12**) mostra correlação de 98% o espectro obtido e a biblioteca do sistema operacional do cromatógrafo, indicando uma boa relação sinal ruído na análise e uma concordância boa com a estrutura sugerida (APÊNDICE I). Além do íon molecular m/z 142, está presente o íon m/z 127. Este resulta da clivagem α à carbonila, gerando a perda do radical metila. Outro íon importante é de m/z 57. Este sinal intenso corresponde à quebra oriunda do rearranjo de *McLafferty*, Figura 3.18.

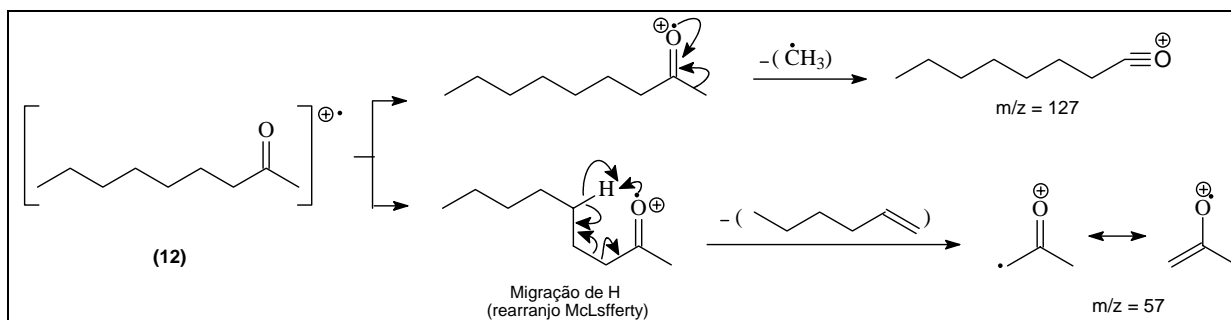


Figura 3.18 - Provável fragmentação observada no cromatograma de CG-EM para a 2-nonanona (**12**).

O escatol (**13**) foi sugerido pela biblioteca do sistema operacional do cromatógrafo com correlação de 84% (APÊNDICE J). No espectro está presente o íon m/z 130, proveniente da perda de H^{\cdot} , que ocorre em aromáticos. Uma perda característica de anéis pirrólicos é a de m/z 27, que corresponde $N\equiv CH$, gerando o íon 103. Também está presente o sinal de m/z 77 $[C_6H_5]^+$, típico de derivados do anel benzeno.

Um dos cetoéteres sugeridos pelo programa foi o 4-oxodecanoato de metila (**14**) de metila, com correlação de 87% (APÊNDICE K). No fragmentograma além do íon molecular m/z 200, fragmentos característicos de ésteres como perda de m/z 31 $[^{\cdot}OCH_3]$ e o sinal de m/z 130, proveniente do rearranjo de *McLafferty*, Figura 3.19.

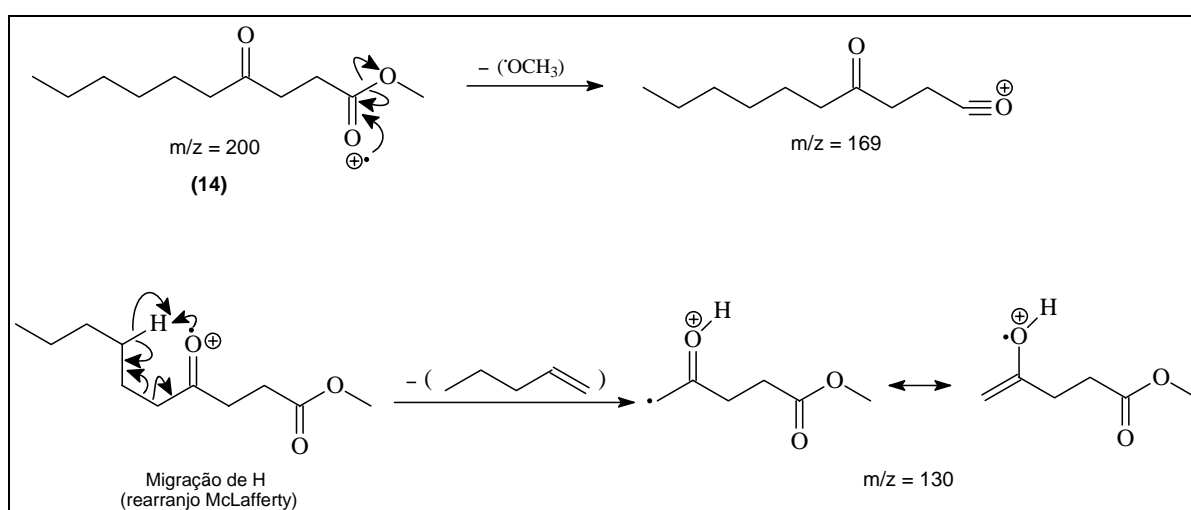


Figura 3.19 - Provável fragmentação observada no cromatograma de CG-EM para o 4-oxodecanoato de metila (**14**).

O sinal de maior intensidade observado no cromatograma total de íons não apresenta uma fragmentação condizente com a fornecida pela biblioteca do sistema operacional do cromatógrafo. A relação entre o fragmentograma experimental e o da biblioteca foi de apenas 62% (APÊNDICE L). A Figura 3.20 mostra o cromatograma experimental.

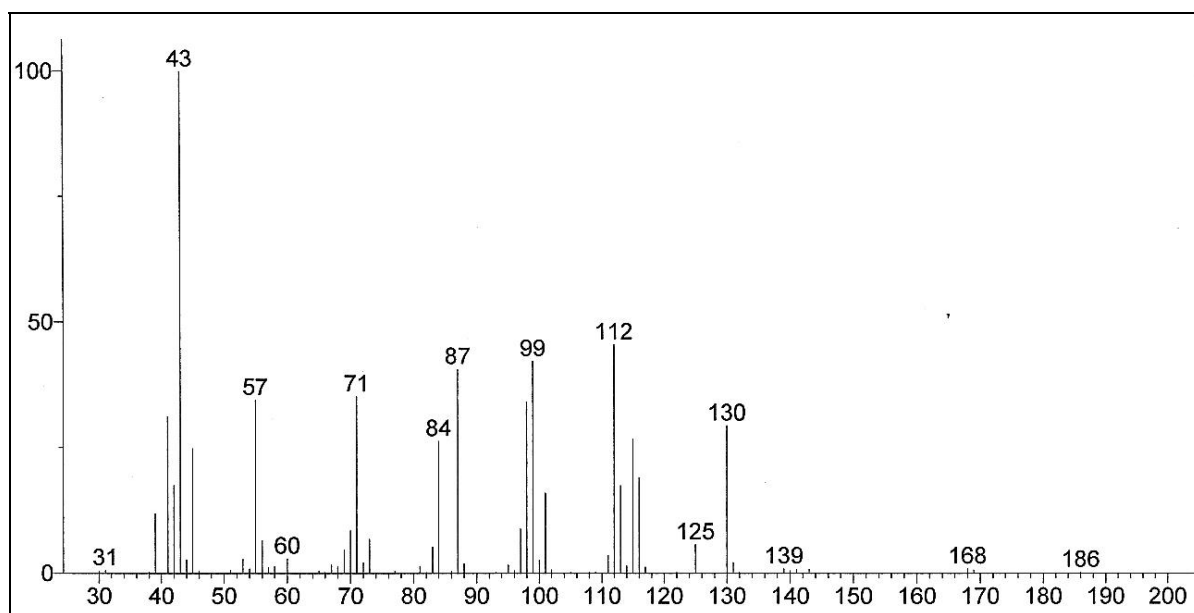


Figura 3. 20 – Espectro de massas experimental do composto de maior intensidade no cromatograma total de íons (X).

Sendo o íon molecular m/z 186, a perda de uma molécula de água origina o m/z 168. Perda de água é típico de alcoóis e ácidos. O m/z 60 é o sinal mais característico de ácidos carboxílicos devido ao rearranjo *McLafferty*. Espectros de ácidos de cadeia longa também se assemelham a séries de hidrocarbonetos em intervalos de 14 unidades. No espectro pode ser observado os sinais de m/z 43, 57 e 71. O espectro obtido por ESI-MS no modo negativo é mostrado na Figura 3.21.

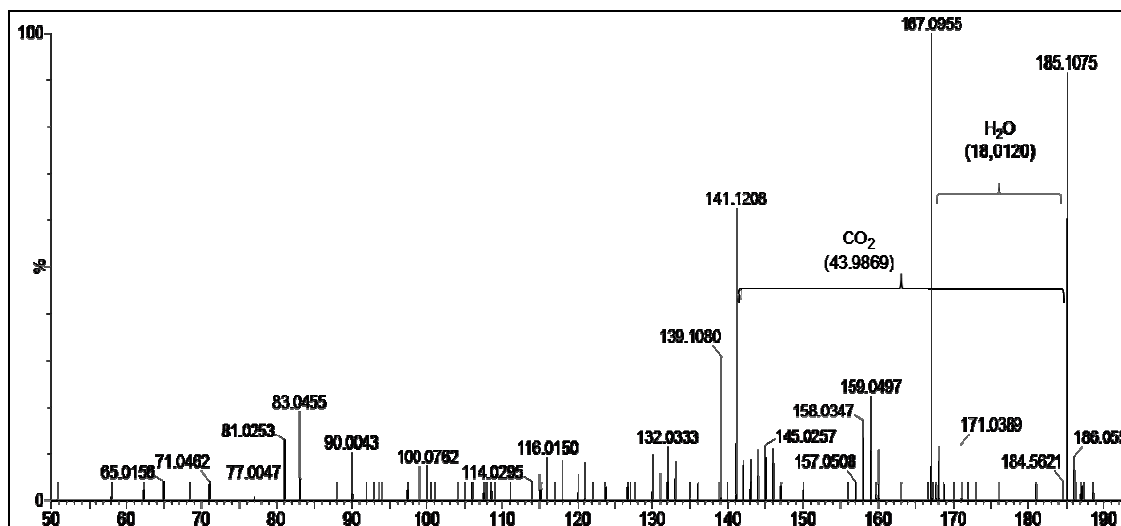


Figura 3. 21 – Espectro de massas ESI(-)MS experimental do aduto $[M + H]^+$ de massa 185,1075 .

A fragmentação e massa exata do composto indicam que este apresenta fórmula molecular $C_{10}H_{18}O_3$. Os fragmentos mais intensos podem ser gerados pela perda de água e dióxido de carbono, características de ácidos.

O ácido 3-hydroxidecanóico (**4**) foi identificado como principal constituinte da glândula metapleurar de *A. octospinosus* (NASCIMENTO *et alii*, 1996 e ORTIUS-LECHNER *et alii*, 2000). Os espectros obtidos indicam um derivado insaturado deste composto (APENDICE M), Figura 3.22.

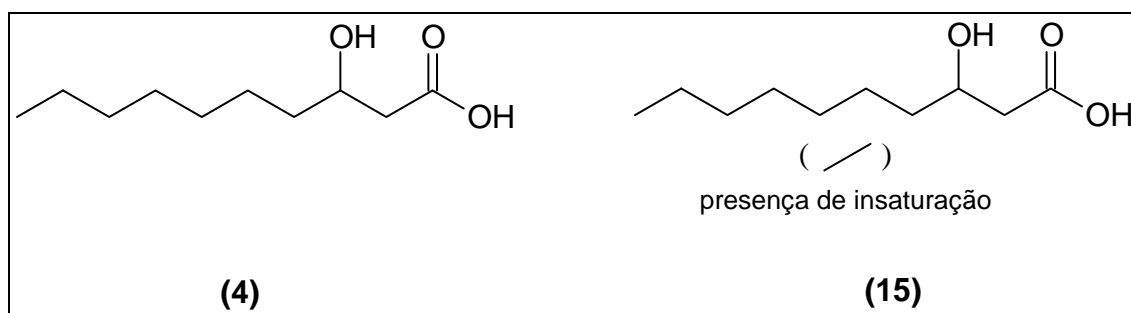


Figura 3.22 – Estrutura dos Hidroxiácido: (4) identificado na glândula metapleurar de *A. octospinosus* (15) sugerido através dos espectros experimentais.

Os espectros de EI-EM ainda mostram a presença do ácido palmítico (**6**), que já foi identificado na glândula metapleurar de *Acromyrmex landolti* e teve

atividade antimicrobiana comprovada (JAFFÉ *et alii*, 1994). Também foi possível constatar a presença de outros compostos oxigenados (APÊNDICES de M à S).

Os demais espectros de massas de ESI-MS dão indícios de compostos que apresentam, principalmente, o grupo funcional ácido. Tal fato é suportado pelas perdas de H₂O, CO e CO₂. No entanto não é possível inferir estruturas baseadas somente nestes dados. A técnica de *electrospray* é muito eficiente para análise de compostos que apresentem alta massa molecular e grupos que sejam facilmente ionizados, como proteínas. Os compostos presentes no EGM são micromoléculas constituídas principalmente de C, H, O. O elemento químico O é um bom aceptor de elétrons e pode ser ionizados. No entanto, após o aduto perder este elemento na fragmentação, não ficam adutos somente da cadeia carbônica em solução. Ou seja, como a perda da carga as moléculas não continuam sendo fragmentadas.

O efeito inibitório de alguns compostos já identificados na glândula metapleurar já foi verificado. O trabalho realizado por Nascimento *et alii* (1996) mostra que hidróxiácidos inibem o crescimento de fungos e bactérias Gram-negativas. Assim como ácido indolacético (5) tem forte influencia sobre o crescimento de hifas e germinação de esporos.

Uma característica interessante nos trabalhos em que os compostos sintéticos são testados separadamente é o fato de muitos deles apresentarem baixa atividade antimicrobiana (BOT *et alii*, 2002 e MENDONÇA *et alii*, 2009). Mostrando que atividades mais altas podem ser decorrentes do sinergismo das substâncias glandulares. Outros compostos, como ácidos de cadeia mais curta, que podem estar presentes em menores proporções, teriam um importante papel acidificando o meio (ORTIUS-LECHNER *et alii*, 2000). Desta forma, torna o ambiente inóspito pra alguns microorganismos. A importância do pH foi observada por Kreisel (1972) onde o autor verificou que removendo as operárias de uma colônia de *Atta insularis* o pH do meio se torna mais básico, subindo de 5 para 6-8. Isto ocasionou o crescimento de fungos e bactérias oportunistas. O fungo com crescimento mais acelerado, em virtude alcalinização do meio, foi o *Escovopsis weberi*, parasita clássico dos ninhos de formigas cortadeiras (CURRIE *et alii*, 1999).

A agricultura praticada pelas formigas cortadeiras tem cerca de 45-65 milhões de anos (CURRIE, 2001 e MUELLER *et alii*, 2001). Os jardins são mantidos no interior de câmeras subterrâneas. Sendo o solo um ambiente microbiológico tão rico e diversificado é fácil supor que a relação mutualista seja constantemente comprometida por patógenos. Porém, durante estes milhões de anos esta relação parece não ter sido afetada por mecanismos de resistência. O que só é possível graças ao uso de antibióticos muito eficazes. Antibióticos estes que são produzidos pela glândula metapleural, além daqueles originários da complexa rede de interações com outros microorganismos existentes nos ninhos.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram que a glândula metapleural representa para *A. subterraneus subterraneus* um sistema de defesa potencial contra microorganismos nocivos na relação formiga-fungo simbiote. Embora as formigas cortadeiras apresentem outros mecanismos de defesa contra agentes patogênicos, nossos resultados confirmam que a glândula metapleural possui um papel primordial na manutenção da assepsia da colônia.

As análises químicas dos compostos da glândula metapleural de *A. subterraneus subterraneus* indicam a presença de ácidos, hidroxiácidos, assim como compostos oxigenados mais voláteis, os últimos não tinham sido relatados anteriormente como presentes na glândula metapleural de *Attines* derivadas.

Os resultados também apresentam indícios do potencial antimicrobiano de moléculas presentes no EGM como ferramenta no combate a infecções causadas pelos microrganismos de importância médica testados.

A importância do conhecimento das substâncias envolvidas na higienização das colônias é interessante, pois podem ser aplicados em métodos de controle que atuem especificamente na fisiologia e bioquímica da interação formiga-fungo simbiote. Isto acontece em decorrência da maior vulnerabilidade ao ataque de agentes patogênicos adquirida pela colônia com a quebra desta defesa natural. Fator que fortalece as grandes barreiras impostas no controle de insetos sociais: estrutura e organização.

CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Formigas cortadeiras constituem um distinto grupo, não só entre as formigas, mas entre os insetos de um modo geral. Tal característica é corroborada pelo fato destes insetos serem considerados derivados e os herbívoros mais bem sucedidos entre os insetos sociais.

A agricultura já é praticada pelas formigas cortadeiras por cerca de 65 milhões de anos. E o aperfeiçoamento desta tecnologia foi fundamental para o sucesso destes insetos. As folhas frescas cortadas são usadas como substrato para o crescimento do fungo, que será a principal fonte de alimentação das formigas. Para manter as colônias livres de competidores, elas fazem uso de mecanismos de higiene muito eficientes. Eliminando qualquer microorganismo ou hifas de fungos indesejados. E ainda quando são infectadas aplicam compostos que protegem os jardins da infestação de leveduras, fungos ou bactérias.

No Capítulo II foi verificado o efeito que o extrato da glândula metapleurial apresenta sobre microorganismos que estão relacionados à ecologia das formigas cortadeiras. A esta glândula já fora relacionada a atividade antimicrobiana em algumas espécies de *Atta*, no entanto somente duas espécies de *Acromyrmex* foram estudadas até o momento. Neste capítulo foi possível observar que o EGM tem efeito bacteriostático retardando o crescimento de *S.aureus* e *E.coli*. Contra os fungos *C.albicans* e *B.bassiana* o efeito foi fungicida. No caso de *B.bassiana* o resultado revela a importância desta glândula na assepsia das colônias, já que este fungo é um entomopatogênico de formigas cortadeiras.

A proposta de elucidação estrutural foi baseada nas análises de CG-EM e ESI-MS. Os problemas encontrados nas análises foram da natureza do extrato que, segundo a literatura, é composto principalmente por ácidos. Estes são pouco voláteis e dificilmente observados nos espectros obtidos por CG-EM. Com relação ao ESI-MS, análises de micromoléculas compostas principalmente por C, H e O são dificilmente ionizadas e pouco fragmentadas. No entanto, com a cromatografia gasosa foi possível observar que os constituintes desta glândula não são apenas ácidos. Compostos mais voláteis como cetona e ésteres também estão presentes.

Apesar de não poder inferir estruturas, a fragmentação nos espectros de ESI-MS dão fortes indícios da presença de ácidos nesta glândula.

No Capítulo I levantamos a hipótese de capina química que poderia estar ocorrendo na confecção das trilhas de forrageamento. Tal fato contribuiria para o sucesso ecológico destes insetos. Isto pode ser explicado pela redução do custo energético com constante manutenção da trilha. O que ocasionaria a maior eficiência no transporte do fragmento vegetal usado como substrato para o cultivo do fungo simbiote. O extrato da glândula de veneno mostrou atividade herbicida contra sementes pré-germinadas de alface. A porcentagem de inibição de crescimento, comparando o controle com o tratamento do EGV, foi de 56%. Esta foi comparável ao herbicida comercial usado como controle negativo Alaclor. A pirazina (**2**) também apresentou efeito herbicida, sendo de 26% a porcentagem de inibição.

As análises químicas do EGV, de CG-EM assim como ESI-MS, indicam duas substâncias que ainda não foram descritas como presentes na glândula de veneno de formigas cortadeiras que são: 2,5-dimetilpirazina (**10**) e 2-acetil-3,5-dimetilpirazina (**11**). Os espectros de ESI-MS ainda revelam indícios de um composto ácido derivado da pirazina (**2**). Para confirmação estrutural de tais compostos será necessário a utilização de outras técnicas analíticas. Uma alternativa é realizar a co-injeção do EGV com padrões adquiridos comercialmente.

O fato de serem usadas formigas provenientes de um ninho do campo pode ter sido um fator primordial para a observação de novos compostos. Já que, a produção de um metabólito usado com esta propriedade herbicida seja estimulada pela necessidade da confecção e manutenção da trilha. Comportamento imprescindível quando estes insetos estão em seu habitat natural.

Compostos derivados de pirazinas são muito usados por várias classes de insetos. No entanto, o sucesso evolutivo que as formigas cortadeiras possuem nos conduziu a averiguar se existe alguma propriedade específica das pirazinas relacionadas a este sucesso. Não podemos deixar de admitir que esta propriedade poderia estar relacionada a outro composto. Contudo as pirazinas são os principais

constituintes das glândulas de veneno de formigas cortadeiras, juntamente com o pirrol (1).

Neste momento não é possível afirmar se a acetilpirazina (11), isoladamente ou em sinergismo com outros compostos glandulares, foi responsável pela acentuada atividade herbicida observada. Nem a influencia deste novo composto no segmento de trilha. Bioensaios realizados posteriormente poderão responder estas perguntas.

Contudo, os resultados corroboram a hipótese levantada, já que uma atividade herbicida dos constituintes da glândula de veneno expressaria menor custo energético e eficiência na atividade de forrageamento realizadas pelas formigas cortadeiras.

REFERÊNCIAS

AIRES-DE-SOUSA, M.; PARENTE, C. E. S. R.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; BONNA, I. C. F.; SILVA, D.A. e LENCASTRE, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples from Rio de Janeiro State, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, 2007 .

ALBRECH, S. J.; FISHMAN, N. O. e KITCHEN, J. Reemergence of gram-negative health care-associated bloodstream infections. **Archives of Internal Medicine**, v. 16, p. 1289-1294, 2006.

ANGUS, C.J.; JONES, K. e BEATTIE, A. J. A possible explanation for size differences in the metapleural glands of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of the Australian Entomological Society**, v.32, p.13-11, 1993.

BACCI, M. J. R.; RIBEIRO, S. B.; CASAROTTO, M. E. F. e PAGNOCCA, F. C. Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 79–82, 1995.

BALABAN, N.; COLLINS, L.V.; CULLOR, J. S.; HUME, E. B.; MEDINA-ACOSTA, E.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; O'CALLAGHAN, R.; ROSSITTO, P. V.; SHIRTLIFF, M.E.; DA SILVEIRA, L.S.; TARKOWSKI, A. e TORRES, J. V. Prevention of diseases caused by *Staphylococcus aureus* using the peptide RIP. **Peptides**, v. 21, p. 1301–1311, 2000.

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

BURTELOW, M. A.; MERKER, J. D. e BARON, E.J. Growth of *Histoplasma capsulatum* isolates is better on potato dextrose agar with chloramphenicol than on brain heart infusion agar. **Journal of Medical Mycology**, v. 19, n 3, p. 197-199, 2009.

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

CARTER, G. R. Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária. 1ª ed. São Paulo: Roca, 1988.

COURVALIN, P. Antimicrobial Drug Resistance: "Prediction Is Very Difficult, Especially about the Future". **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 10, 2005.

CUNY, C.; FRIEDRICH, A.; KOZYTSKA, S.; LAYER, F.; NÜBE, U.L; OHLSEN, K.; STROMMINGER, B.; WALTHER, B.; WIELER, L. e WITTE, W. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SARM) in different animal species. **International Journal of Medical Microbiology**, online desde 16 dezembro de 2009.

CURRIE, C. R. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 357–80, 2001.

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

DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F.; ANJOS, N. e MOREIRA, D. D. O. Criação de formigas cortadeiras em laboratório. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (ed.), **As formigas cortadeiras**, pg. 151-162. Ed. Folha de Viçosa, 262p., 1993.

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E.; SPECHT, A. e BORTOLÁS, E. P. Emprego do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em iscas para o controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex* spp. em floresta implantada de *Eucalyptus grandis*. In: **Anais do 7º Congresso Florestal Estadual**. Nova Prata, RS, Brasil, p 1139-1150, 1996.

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E.; SPECHT, A. e VALIM-LABRES, M.E. Efficiency of *Beauveria bassiana* for *Acromyrmex* spp. Control (Hymenoptera: Formicidae). **Anais Sociedade Entomologia Brasil**, p. 281-285, 1993.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; REHNER, S. A. e WCISLO, W.T. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. **Proceedings of the Royal Society**, v. 273, p. 1689–1695, 2006.

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

GIBSON, A. M. e ROBERTS, T. A. The effect of pH, water activity, sodium nitrite and storage temperature on the growth of enteropathogenic *Escherichia coli* and salmonellae in a laboratory medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 183-194, 1986.

HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H. e SPITELLER, D. Candidicin producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 12, p. 4742-6, 2009.

HAMILTON, W.D. The genetical evolution of social behaviour, I. **Journal of Theoretical Biology**, v. 7, p.1-16, 1964.

HAMILTON, W.D. Selfish and spiteful behaviour in an evolutionary model. **Nature** 228, p. 1218-1220, 1970.

HAMILTON, W.D. Altruism and related phenomena, mainly in social insects. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 3, p.193-232, 1972.

HOLLDOBLE, B. & ENGEL-SIEGEL, H. On the metapleural gland of ants. **Pysche**, v. 91, p. 201-224, 1984.

HUGHES, W.O.H.; L., THOMSEN; J., EILENBERG e BOOMSMA, J.J. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, p.46-53, 2004.

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

KREISEL, H. Pilze aus pilzgarten von *Atta insularis* in Kuba. **Z Allg Mikrobiol**, v. 12, p. 643–654, 1972.

LITTLE, A.E.F. & CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant–microbe symbiosis. **Biology Letters**, v.3, p.501–504, 2007.

LITTLE, A.E.F. & CURRIE, C. R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus growing ants. **Ecology**, v.89, p.1216–1222, 2008.

MASCHWITZ, U.; KOOB, K. e SCHILDKNECHT, H. Ein Beitrag zur Funktion der Metathorakaldr use der Ameisen. **Journal of Insect Physiology**, v. 16, p. 387–404, 1970.

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

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

MOORE, C.; HINGWE , A.; DONABEDIAN , S.M.; PERRI, M.B.; DAVIS, S.L.; HAQUE, N.Z.; REYES, K.; VAGER, D. e ZERVOS, M.J. Comparative evaluation of epidemiology and outcomes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SARM) USA300 infections causing community- and healthcare-associated infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 2, p.148-155, 2009.

MUELLER, U.G.; SCHULTZ, T.R.; CURRIE, C.R.; ADAMS, R.M.M. e MALLOCH, D. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Quarterly Review of Biology**, v.76, p.169-197, 2001.

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

ORTIUS-LECHNER D.; MAILE, R.; MORGAN, E. D. e BOOMSMA, J. J. Metapleural gland secretion of the leaf-cutter ant *Acromyrmex octospinosus*: New compounds and their functional significance. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 7, p. 1667-1683, 2000.

PAGNOCCA, F.C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N.S. e BACCI, M.J.R. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf cutting ants. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 94, p.517-526, 2008.

PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; COMODO, N. e NOSTRO, L.O. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (SARM). **Food Control**, v. 18, p. 196-200, 2007.

PERLROTH, J; CHOI, B. e SPELLBERG. B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical Mycology**, v. 45, p. 321-346, 2007.

POMBA, C.; HASMAN, H.; CAVACO, L.M.; DINIZ DA FONSECA, J. e AARESTRUP, F.M. First description of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SARM) CC30 and CC398 from swine in Portugal. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 2, p. 193-194, 2009.

RAY, N.; OATES, J.; TURNER, R.J. e ROBINSON, C. DmsD is required for the biogenesis of DMSO reductase in *Escherichia coli* but not for the interaction of the DmsA signal peptide with the Tat apparatus. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 534, p.156-160, 2003.

REHNER, S.A. Phylogenetics of the Insect Pathogenic Genus *Beauveria*. In **Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution**. New York: Oxford University Press, 2005. p. 4-12.

RODRIGUES, A.; CARLETTI, C. D.; BUENO, O. C. e PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 64-67, 2008.

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

SCHILDKNECHT, H. Chemical ecology – A chapter of modern natural products. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 15, p. 214-22, 1976.

SCHILDKNECHT, H. & KOOB, U. Plant bioregulators in the metathoracic glands of myrmicine ants. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 9, p. 173, 1971.

SCHMID-HEMPEL, P. **Parasites in Social Insects**. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 1998.

SILVA, M.E. & DIEHL-FLEIG, E. Avaliação de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos para controle da formiga *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) (Hymenoptera: Formicidae). **Anais Sociedade Entomologia Brasil**, v. 17, p. 263-269, 1988.

SILVA, G.E.; MACHADO, V.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E. e SPECHT, A. Potencial de *Beauveria bassiana* (Novamente!) como agente de controle das formigas cortadeiras em áreas de reflorestamento. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 15, p. 87-94, 1993.

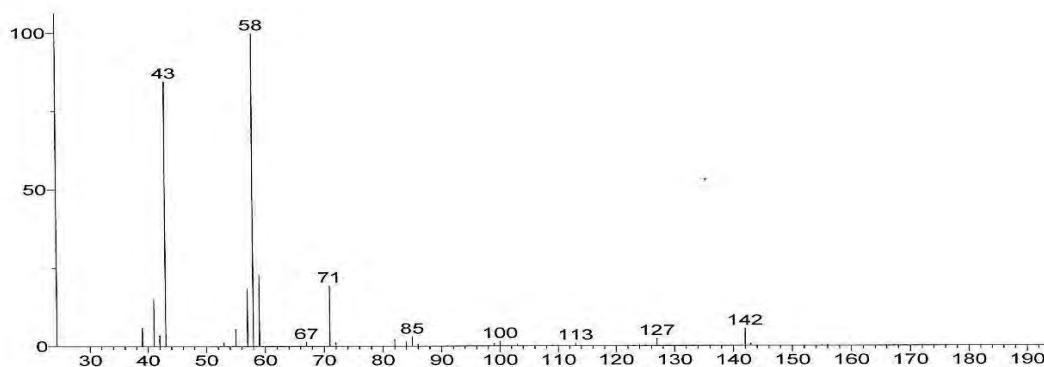
SEN, R.; ISHAKA, H. D.; ESTRADA, D.; DOWD, S. E.; HONG, E. e MUELLER, U.G. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 42, p. 17805-17810, 2009.

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

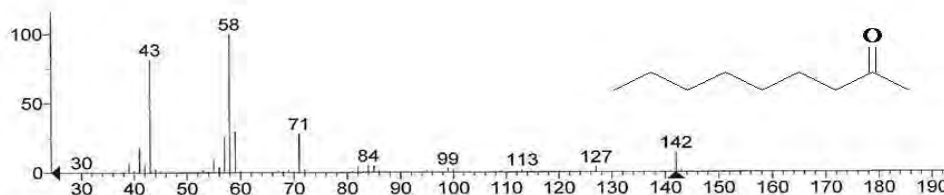
APÊNDICES

APÊNDICE I – Espectro de massas correspondente ao sinal (VII) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula metapleurale.

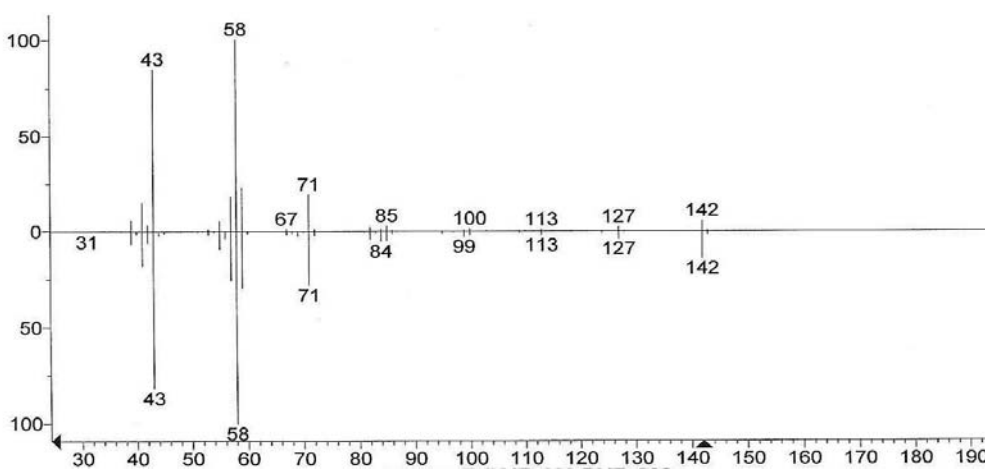
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

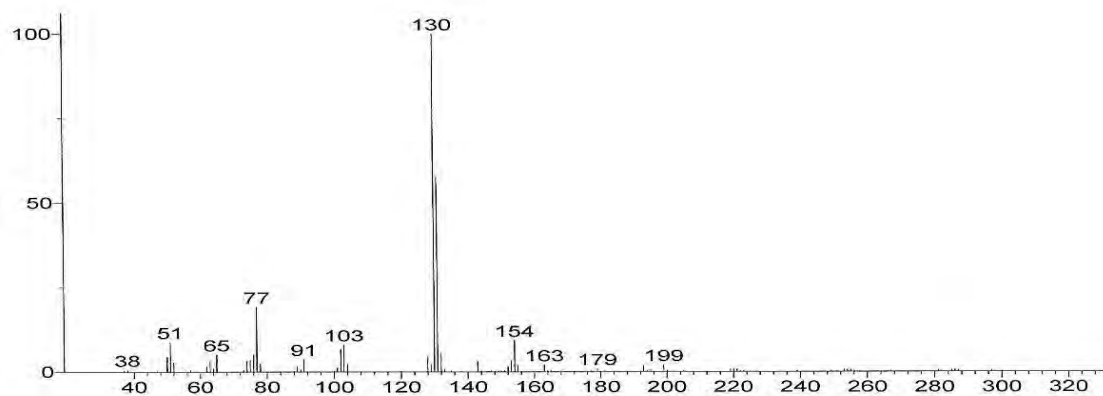


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

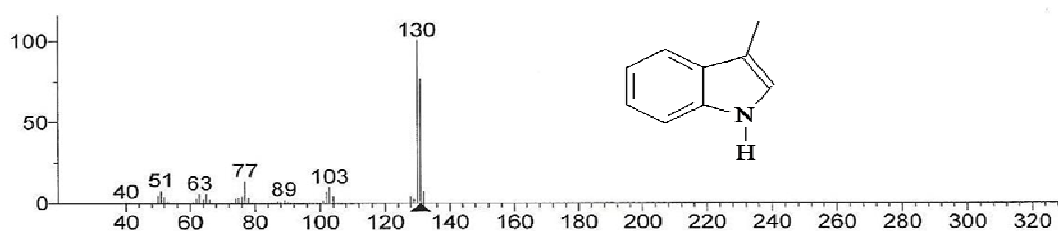


APÊNDICE J – Espectro de massas correspondente ao sinal (VIII) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula metapleurale.

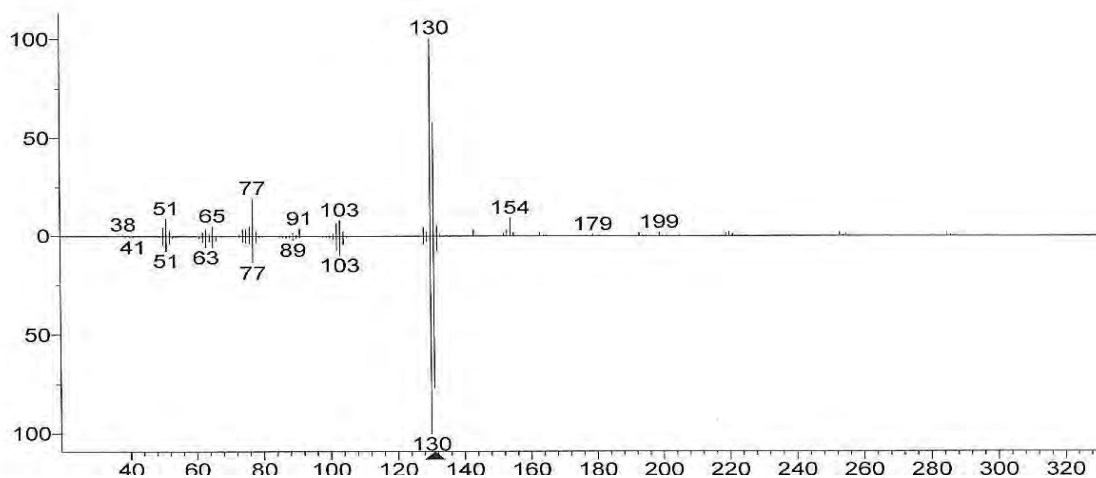
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

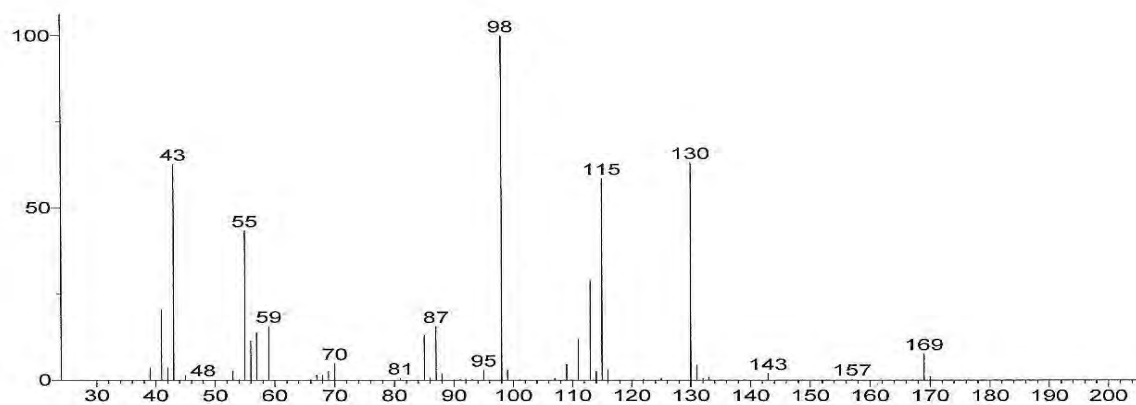


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

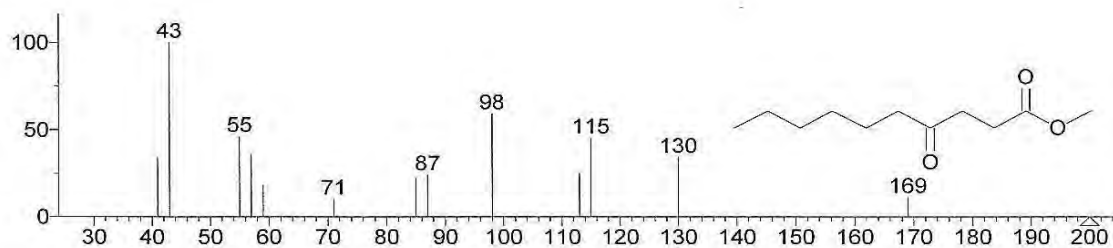


APÊNDICE K – Espectro de massas correspondente ao sinal (VIX) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula metapleuraral.

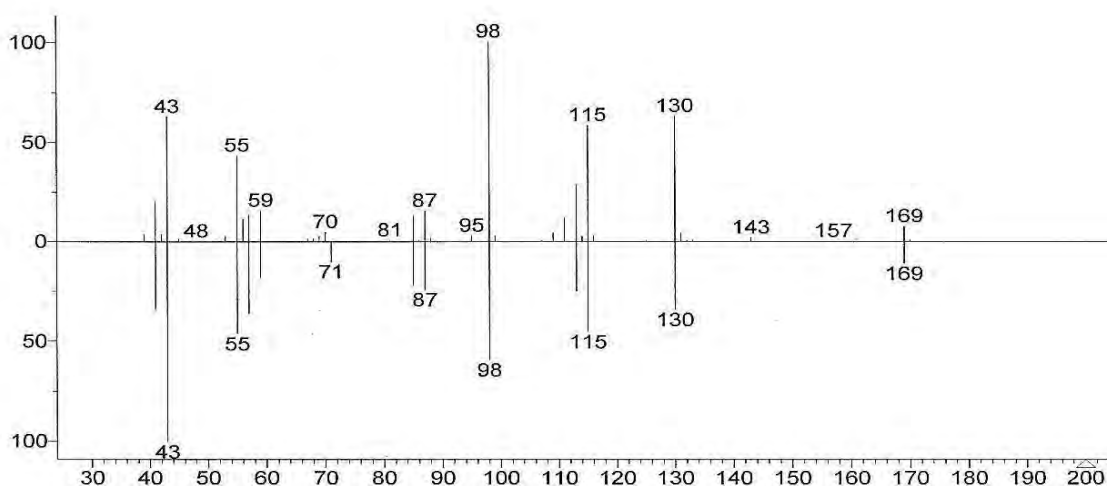
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

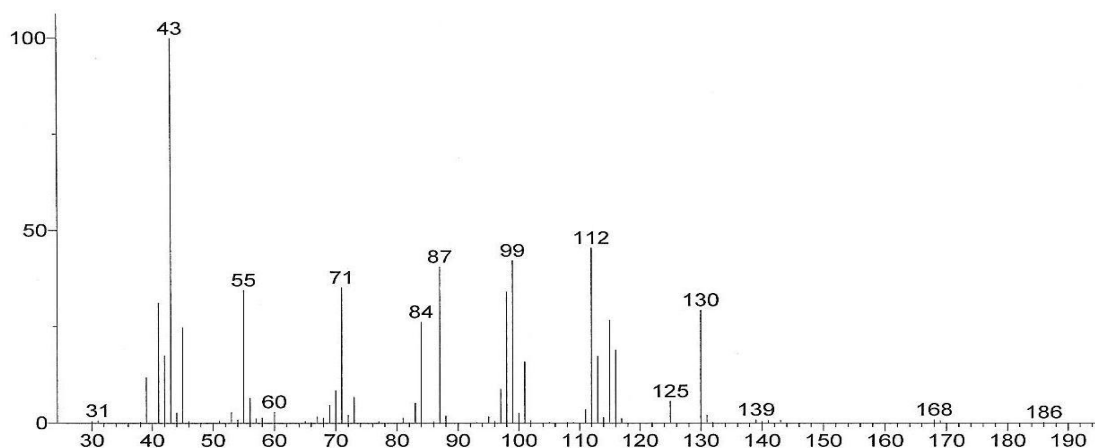


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

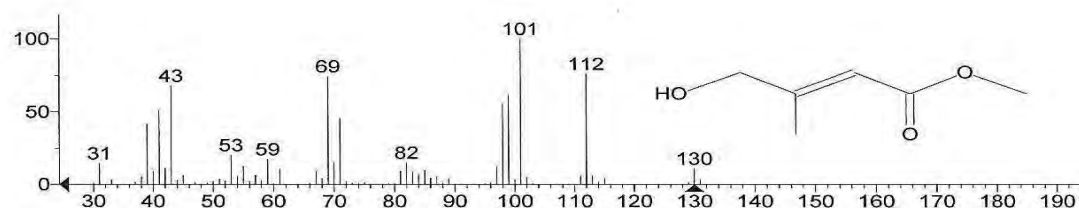


APÊNDICE L – Espectro de massas correspondente ao sinal (X) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula metapleural.

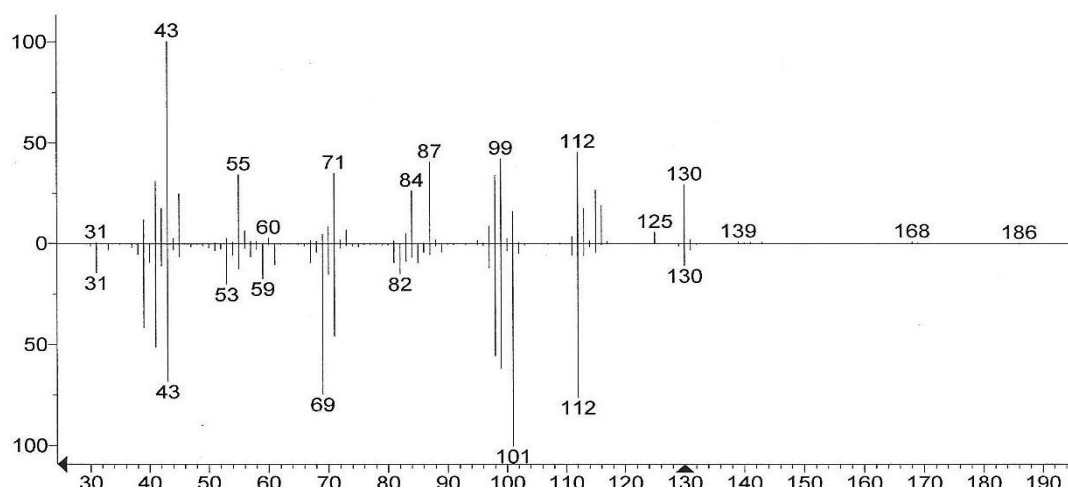
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

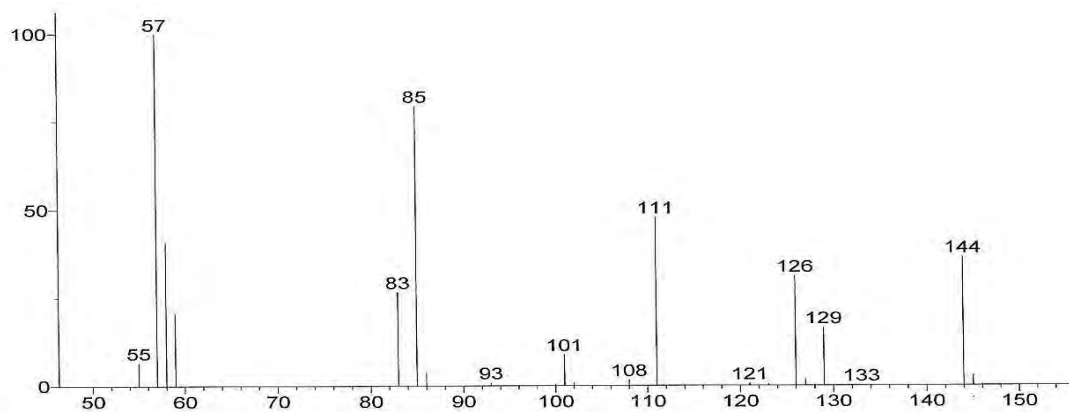


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

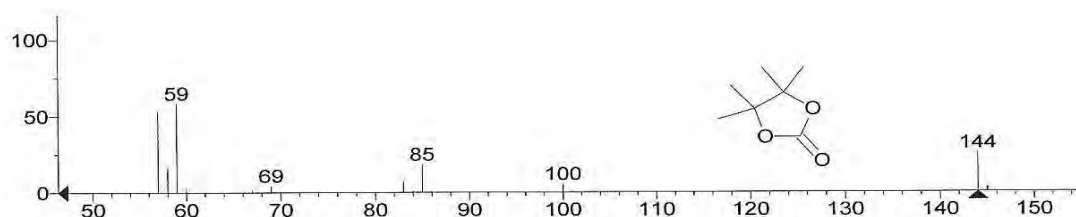


APÊNDICE M – Espectro de massas correspondente ao sinal (XI) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula metapleural.

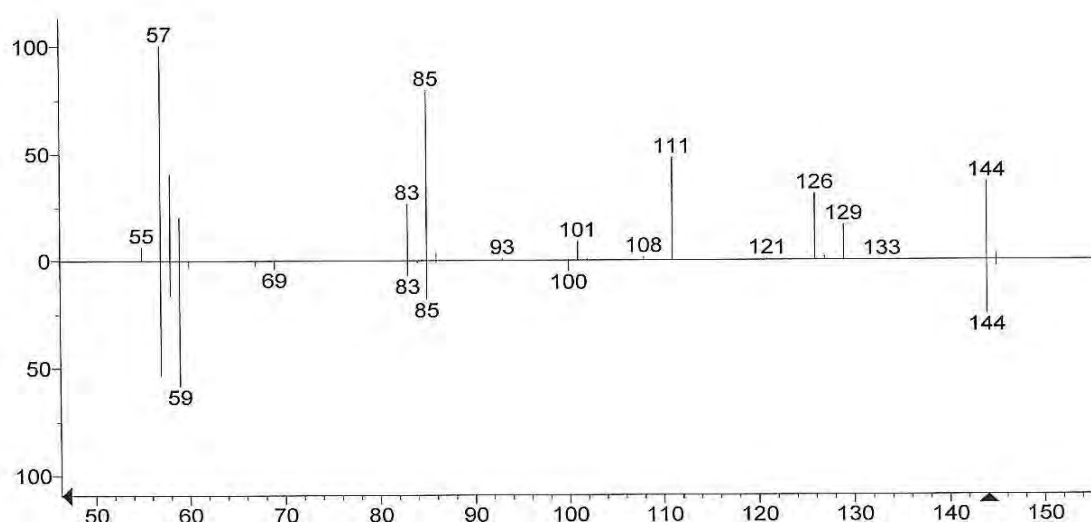
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

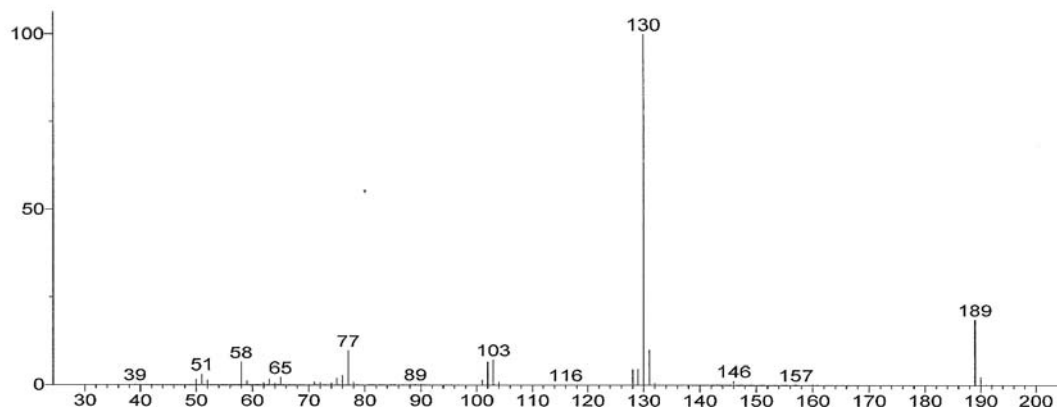


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

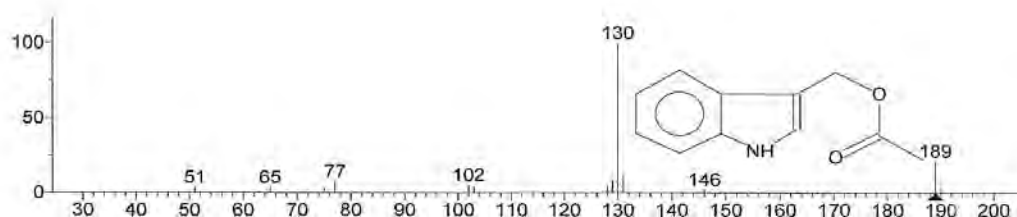


APÊNDICE N – Espectro de massas correspondente ao sinal (XII) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula metapleural.

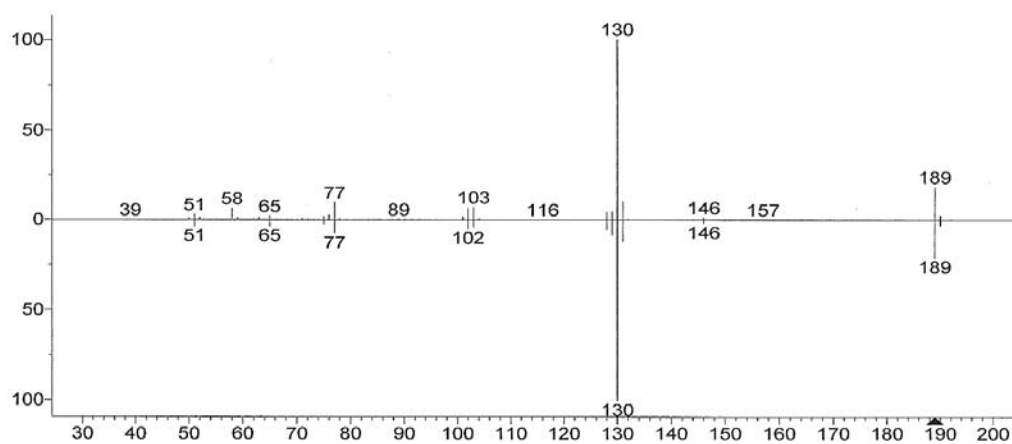
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

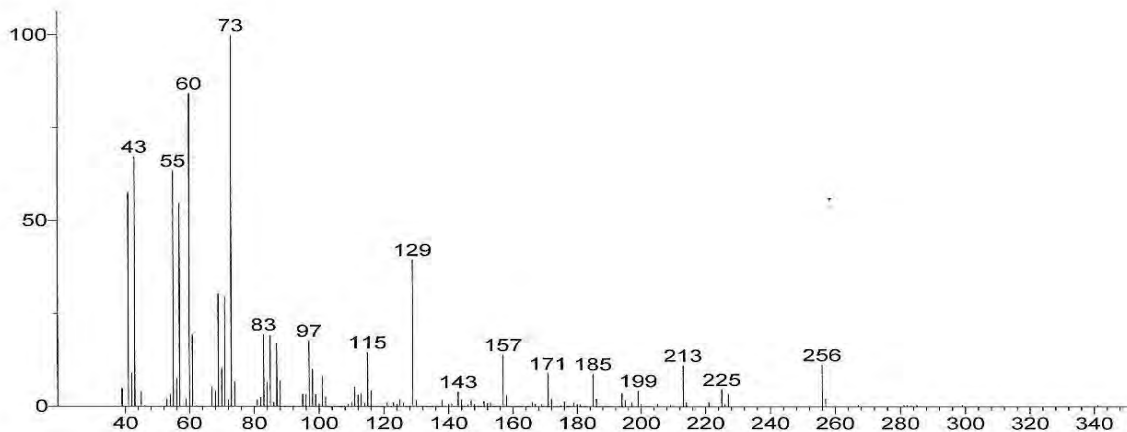


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

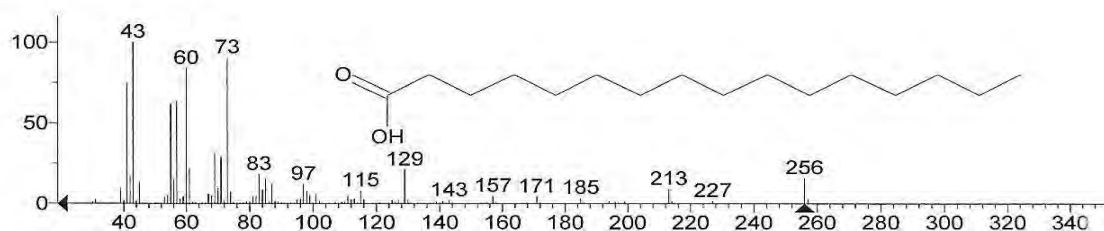


APÊNDICE O – Espectro de massas correspondente ao sinal (XIII) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula metapleurar.

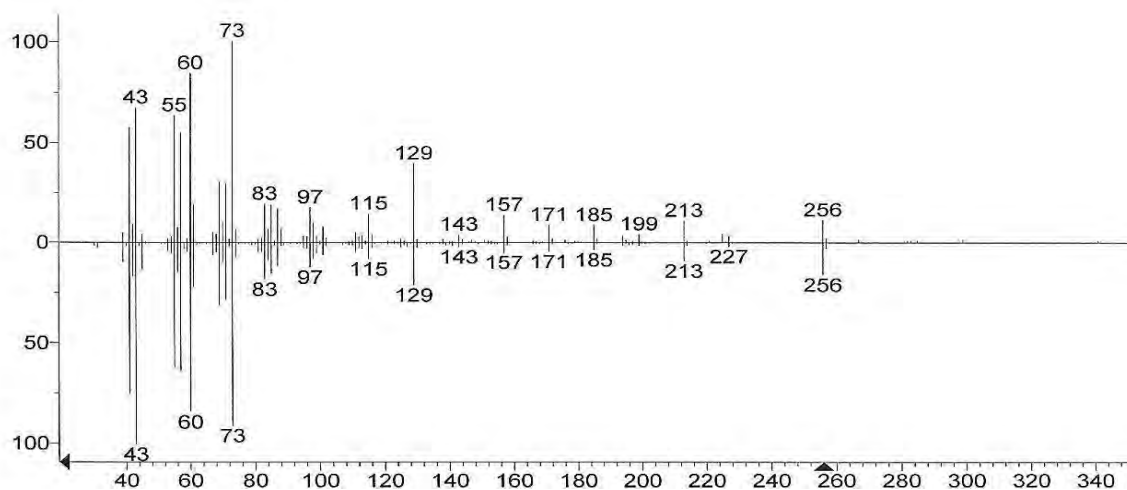
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

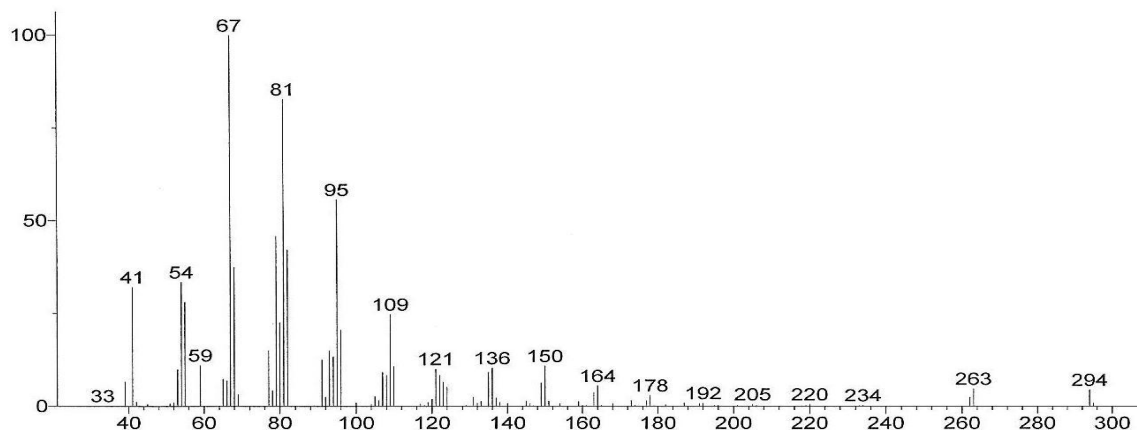


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

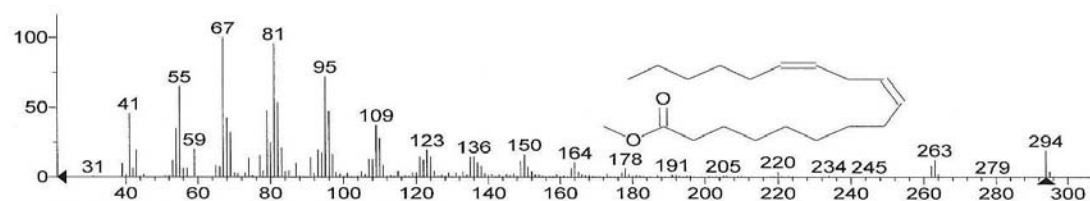


APÊNDICE P – Espectro de massas correspondente ao sinal (XIV) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula metapleurale.

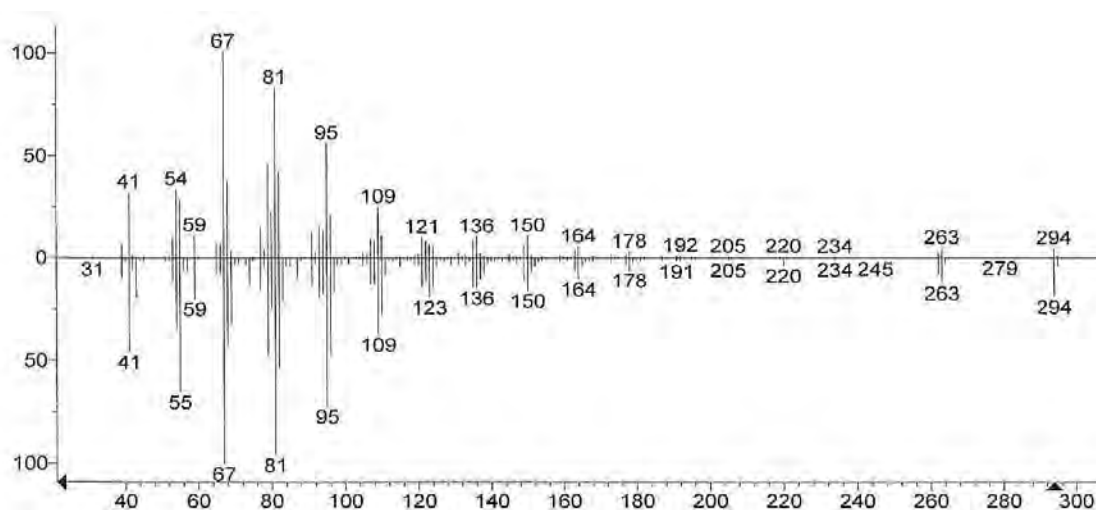
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

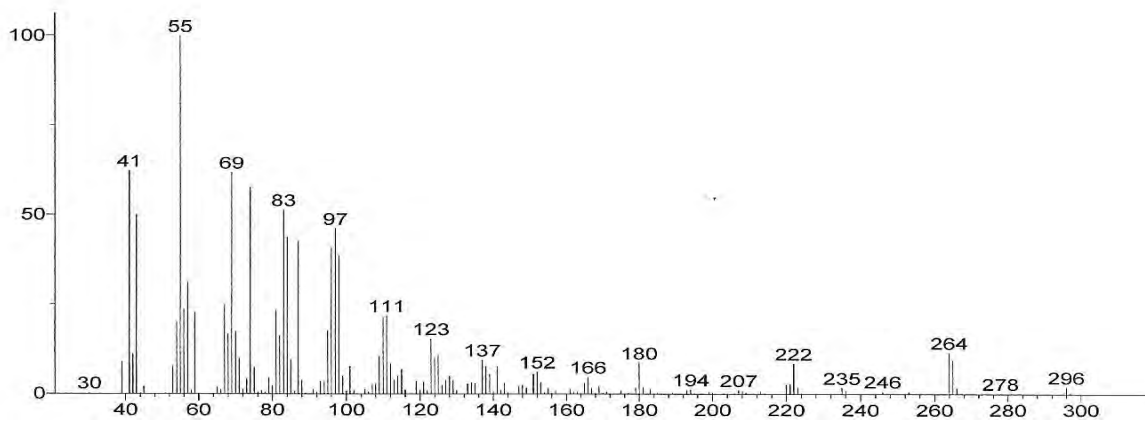


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

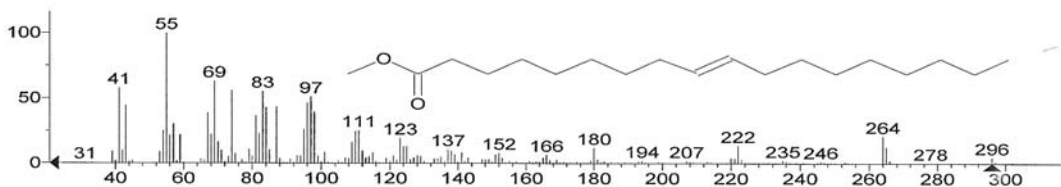


APÊNDICE Q – Espectro de massas correspondente ao sinal (XV) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula metapleural.

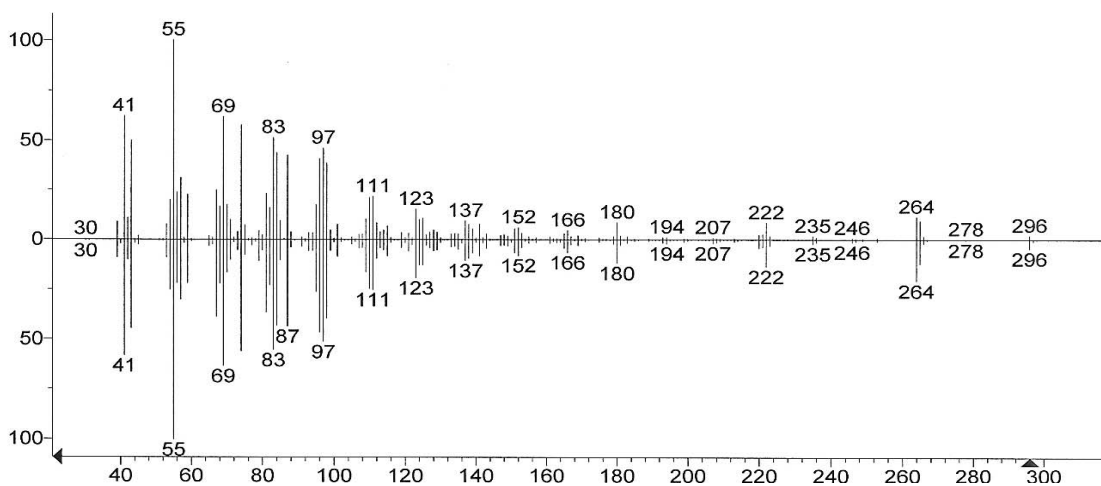
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

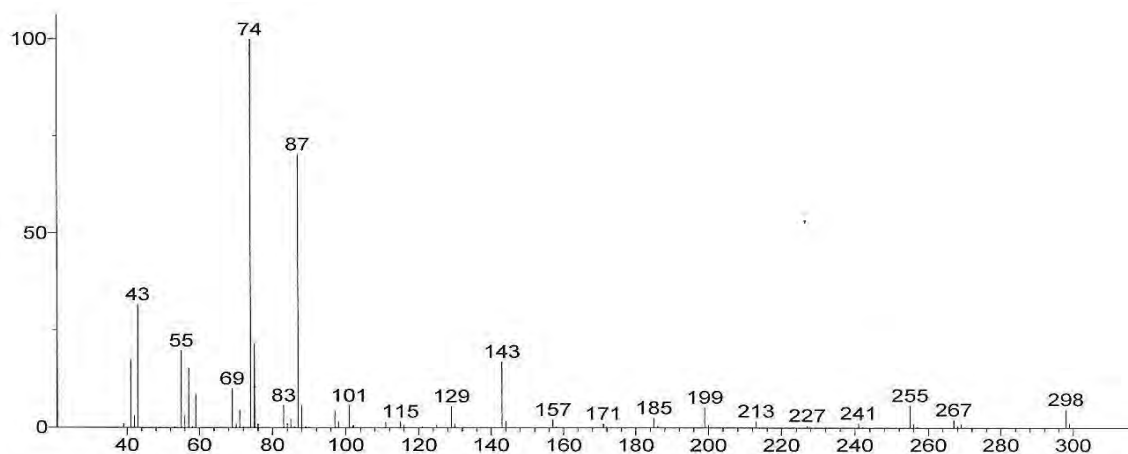


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

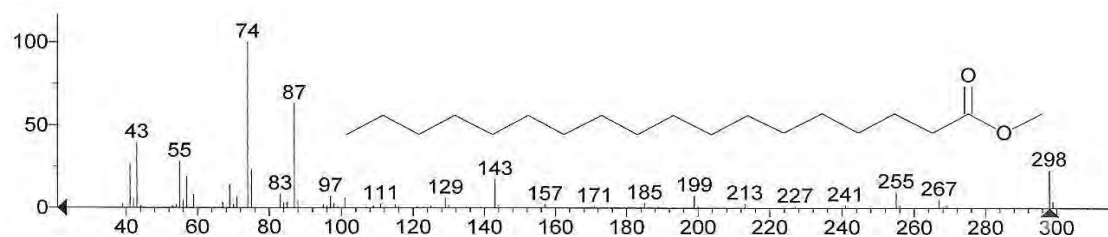


APÊNDICE R – Espectro de massas correspondente ao sinal (XVI) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula metapleural.

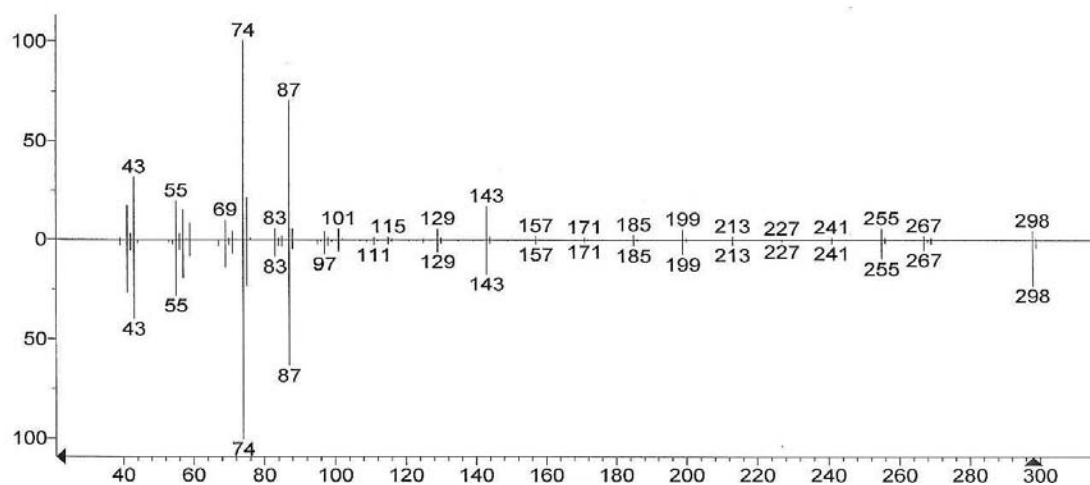
Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa

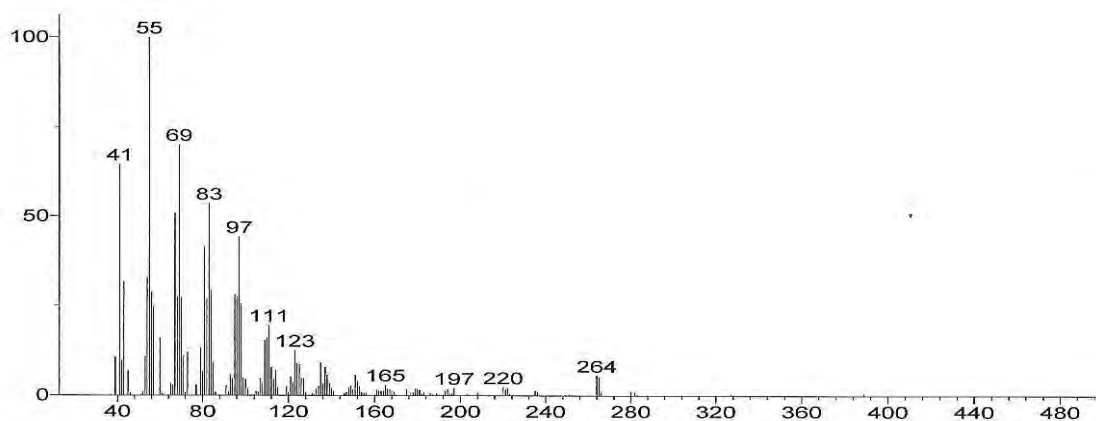


Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

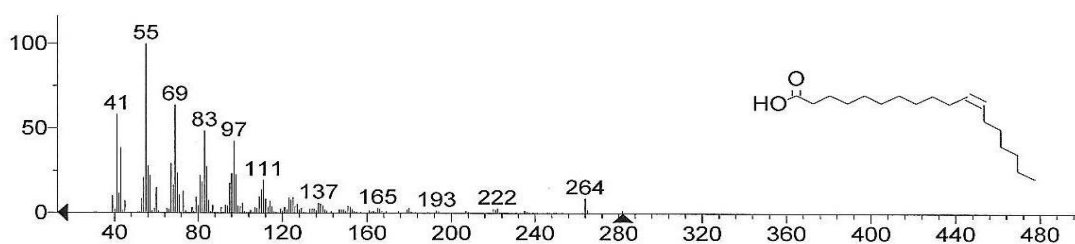


APÊNDICE S – Espectro de massas correspondente ao sinal (XVII) no fragmentograma de íons totais obtido para o extrato da glândula metapleuraral.

Espectro experimental



Espectro da estrutura sugerida pela biblioteca do programa



Comparação entre os espectros experimental (superior) e teórico (inferior)

