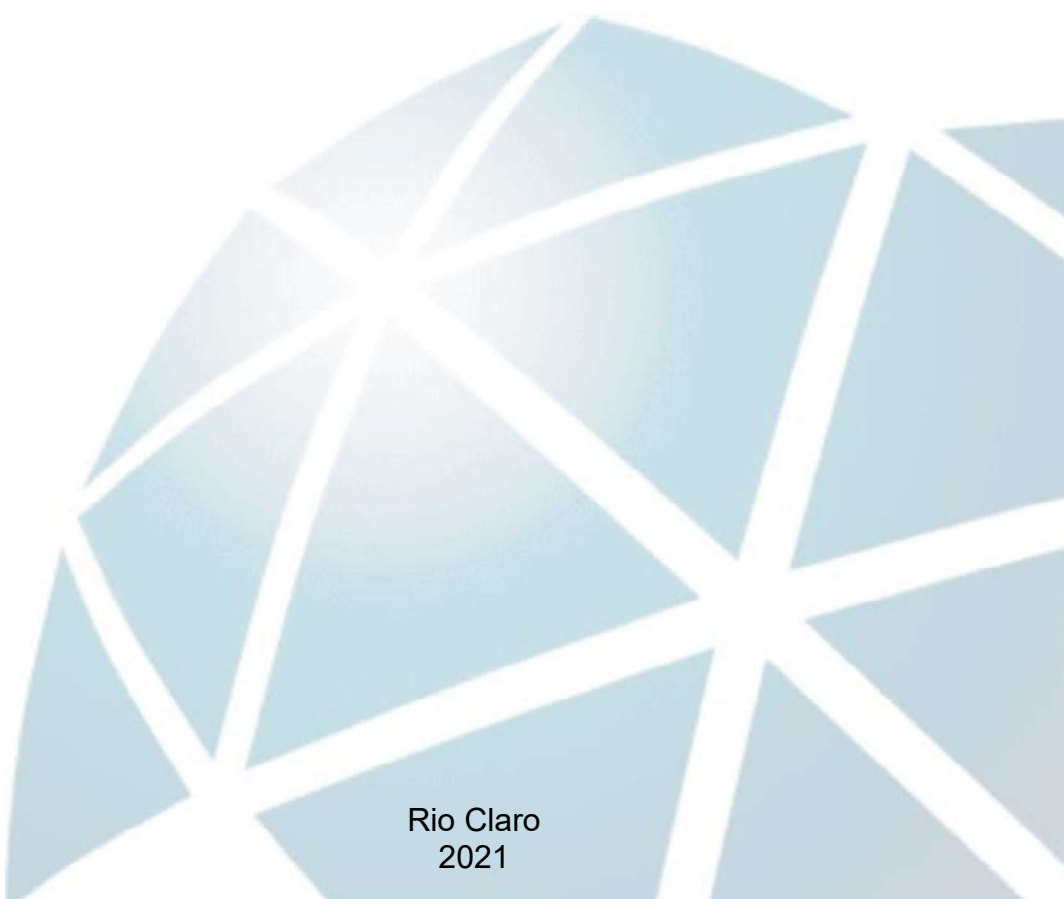

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Marília Soccal da Silva

**Análise comparativa dos túbulos de Malpighi
de operárias de *Atta sexdens* em diferentes
fases de desenvolvimento**



Rio Claro
2021

MARÍLIA SOCCAL DA SILVA

ANÁLISE COMPARATIVA DOS TÚBULOS DE MALPIGHI DE
OPERÁRIAS DE *ATTA SEXDENS* EM DIFERENTES FASES DE
DESENVOLVIMENTO

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno

Coorientadora: Ma. Mayara Cristina Pereira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2021

S586a

Silva, Marília Soccal da

Análise comparativa dos túbulos de Malpighi de operárias de *Atta sexdens* em diferentes fases de desenvolvimento / Marília Soccal da Silva. -- Rio Claro, 2021
28 p. : fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Odair Correa Bueno

Coorientadora: Mayara Cristina Pereira

1. Formigas-cortadeiras. 2. Sistema excretor. 3. Insetos holometábolos. 4. Análise morfológica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, a minha irmã e ao meu noivo, por sempre me apoiarem a seguir em frente com os meus sonhos e a enfrentar momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

A minha família, pais e irmã que sempre estiveram ao meu lado me apoiando, sem eles nada disso seria possível. Amo vocês.

Ao meu noivo por toda paciência e apoio nos dias difíceis. Te amo.

Agradeço ao professor Odair Correa Bueno por todo ensinamento e por me orientar na realização deste projeto.

Agradeço à minha co-orientadora Mayara Cristina Pereira por todo apoio, ensinamento e paciência.

Aos amigos do laboratório, Zé, Lari, Bia, Tati, Amanda e Dai, por toda ajuda, conversas, risadas e cafés da tarde. Vocês tornaram meus dias de laboratório mais divertidos.

A minha turma CBN 016 pelas risadas, sofrimentos coletivos e pela viagem maravilhosa ao Pantanal. Boa sorte a todos, que vocês sejam muito realizados como biólogos.

As minhas amigas de classe, Neide, Di, Lili e Gi, por terem me ajudado durante a graduação e por terem tornado minhas noites mais alegres. Vou sentir muitas saudades, obrigada por essa amizade linda.

Agradeço a minha melhor amiga, Gabriela, pelas risadas altas durante a madrugada, pelos conselhos, pelas broncas, pelas festas. Enfim, desejo a você toda sorte do mundo, minha dupla preferida. Amo você.

A Bateria Porcaria, onde conheci pessoas incríveis que fizeram meus dias melhores durante esses anos de graduação. Uma bateria que levarei no coração pelo resto da vida.

A República Taco, onde morei durante dois anos com pessoas sensacionais, Mc, Pato, Gabi, Princesa e Relaxo, só tenho a agradecer pelas risadas, pelo nervosismo e pelas noites de jogos.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

RESUMO

As formigas-cortadeiras, pertencentes ao gênero *Atta* e *Acromyrmex*, são insetos dominantes da região Neotropical. Essas formigas coletam materiais vegetais que servem de substrato para o crescimento de seu fungo simbiote *Leucogaricus gongylophorus*. Esses insetos são chamados de eussociais e, portanto, possuem castas reprodutivas e estéreis, cuidado com a prole e sobreposição de gerações. Por serem insetos holometábolos, apresentam as seguintes etapas de desenvolvimento: ovo, larva, pupa, imago recém-emergido e imago adulto. Em seu sistema excretor, o órgão mais importante são os túbulos de Malpighi: filamentos delgados e longos que estão localizados na parte posterior do gáster. O objetivo da presente pesquisa foi caracterizar morfológicamente, a partir de microscopia óptica e eletrônica de varredura, os túbulos de Malpighi de *Atta sexdens* em diferentes fases de desenvolvimento. Os grupos definidos para esse estudo foram: larva, pupa de olho escuro e imago adulto. Para análise morfológica, os túbulos de Malpighi foram dissecados sob estereomicroscópio e o material foi processado de acordo com as etapas de rotina para microscopia óptica, em que foram corados com hematoxilina-eosina, e para microscopia eletrônica de varredura. As técnicas histológicas utilizadas permitiram comparar a morfologia dos túbulos de Malpighi nas diferentes fases de desenvolvimento desta espécie de formiga-cortadeira. Verificou-se que o tamanho e o número de túbulos variam nos diferentes estágios de desenvolvimento e que o intestino posterior está ausente no estágio larval. Estudos de base acerca dos órgãos internos dessa espécie de formiga podem contribuir para o esclarecimento de seu sistema excretor e suas funções durante o desenvolvimento desse inseto.

Palavras-chave: formigas-cortadeiras; sistema excretor; insetos holometábolos; análise morfológica.

ABSTRACT

Leaf-cutting ants, which belong to the genus *Atta* and *Acromyrmex*, are dominant insects in the Neotropical region. These ants collect plant materials that serve as a substrate for the growth of their symbiotic fungus *Leucogaricus gongylophorus*. These insects are called eussocial and therefore, have reproductive and sterile castes, care for offspring, and overlapping generations. Because they are holometabolous insects, they present the following stages of development: egg, larva, pupa, newly emerged imago and adult imago. In its excretory system the most important organ are the Malpighian tubules, which are thin and long filaments located in the rear end of the gaster. The objective of this research is to characterize, morphologically, using optical and scanning electron microscopy, the Malpighian tubules of *Atta sexdens* in different stages of development. The groups defined for this study were: larva, dark-eyed pupa and adult imago. For morphological analysis, Malpighian tubules were dissected under a stereomicroscope and the material was processed according to the routine steps for optical microscopy, in which they were stained with hematoxylin-eosin, and for scanning electron microscopy. The histological techniques used make it possible to compare the morphology of the Malpighian tubules in the different stages of development of this species of leafcutter ant. It was found that the size and number of tubules vary at different stages of development and that the posterior intestine is absent in the larvae stage. Basic studies on internal organs of this type of form can contribute to the understanding of its excretory system and its functions during the development of this insect.

Key-words: Leaf-cutting ants; excretory system; holometabolous insects; morphological analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografias sob estereomicroscópio dos túbulos de Malpighi nos três estágios de desenvolvimento de *A. sexdens*. A e B: tubo digestório e túbulos de Malpighi de imago adulto com e sem coloração, respectivamente; C e D: tubo digestório e túbulos de Malpighi de pupa de olho escuro com e sem coloração, respectivamente; E e F: tubo digestório e túbulos de Malpighi de larva com e sem coloração, respectivamente. Setas amarelas: papo; setas vermelhas: ventrículo; setas pretas: túbulos de Malpighi; setas azuis: íleo e reto.....**18**

Figura 2 - Fotomicrografias dos túbulos de Malpighi de diferentes estágios de desenvolvimento de *Atta sexdens*. A, B e C: imago adulto; D, E e F: pupa de olho escuro; G, H e I: larva. Legenda: TM: túbulos de Malpighi; n: núcleo; l: lúmen; t: tecido adjacentes do ventrículo ou corpo gorduroso. A - 200x (A, D e G); 400x (B, C, E, F, I e J)..... **21**

Figura 3 - Fotomicrografia dos túbulos de Malpighi dos adultos de *A. sexdens*. Legenda: TM: túbulos de Malpighi; P: papo; V: ventrículo; IP: intestino posterior (íleo e reto)..... **22**

Figura 4 - Fotomicrografia dos túbulos de Malpighi das pupas de olho escuro de *A. sexdens*. Legenda: TM: túbulos de Malpighi; P: papo; V: ventrículo; IP: intestino posterior (íleo e reto).....**23**

Figura 5 - Fotomicrografia dos túbulos de Malpighi da fase larval de *A. sexdens*. Legenda: TM: túbulos de Malpighi; P: papo; V: ventrículo.....**23**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Insetos sociais.....	10
1.2 Relação de simbiose e composição do formigueiro.....	11
1.3 Aspectos morfológicos.....	12
2 OBJETIVO.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Material biológico.....	14
3.2 Registro fotográfico através do estereomicroscópio.....	15
3.3 Análise histológica e microtomia.....	15
3.4 Técnica de Microscopia Eletrônica de varredura.....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	16
4.1 Fotografia sob estereomicroscópio.....	17
4.2 Microscopia óptica - técnica HE.....	20
4.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	22
5 CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

Constituindo o maior grupo de animais existentes atualmente, com aproximadamente um milhão de espécies, os insetos são invertebrados com grande sucesso evolutivo e, devido as suas capacidades adaptativas, ocupam todos os ecossistemas terrestres, habitando a vegetação, locais úmidos e até o corpo de outros animais (GULLAN & CRANSTON, 2000; TRIPLEHORN & JOHNSON, 2005).

As formigas são insetos dominantes da região Neotropical, habitam diferentes ambientes terrestres, exceto os pólos e em altitudes de até 2.500 metros. Segundo o catálogo Mundial de Bolton, mais de 16.000 espécies e 283 gêneros de formigas foram catalogadas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; AntWeb, 2020).

A família Formicidae agrupa 17 subfamílias, a subfamília Myrmicinae é a mais diversa, compreende 6.772 espécies, 143 gêneros e 6 tribos. Dentre elas, a maior é a tribo Attini, que inclui a subtribo Attina, constituída por 17 gêneros de formigas cultivadoras de fungo. Dentre os gêneros, três deles são considerados os mais derivados, *Atta*, *Acromyrmex* e *Amoimyrmex*, com ninhos grandes contendo milhares de operárias, cultivam seu fungo simbiote utilizando material vegetal fresco como substrato. Devido ao comportamento de corte de material vegetal, esses três gêneros são conhecidos popularmente como formigas-cortadeiras ou saúvas (WARD et al., 2014; BACCARO et al., 2015; WARD AntWeb, 2020; CRISTIANO et al., 2020).

As formigas-cortadeiras desempenham um papel importante no ecossistema, em termos de diversidade, fluxo de energia e ciclagem de nutrientes. O forrageamento das formigas à procura de folhas frescas e a criação dos formigueiros alteram as propriedades do solo, melhorando a aeração e drenagem que, conseqüentemente, otimiza a penetração de raízes, e também aumenta a gama de mineralização de nutrientes e matéria orgânica (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; PERFECT; VANDERMEER, 1993; DELLA LUCIA, 2014; WILSON, 1971).

Consideradas como “pragas agrícolas”, as saúvas são assim chamadas pelos agricultores por apresentarem forte atividade de corte de materiais vegetais frescos. As perdas econômicas ocasionadas pelas formigas podem atingir bilhões de dólares, segundo estimativas globais. Para controlar essa grande perda, o método mais eficaz utilizado atualmente, é o controle químico, seja por nebulização ou por iscas tóxicas. Mas, devido a alta toxicidade não-seletiva, alguns inseticidas foram proibidos em países da América Latina

(HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; NOGUEIRA-NETO, 1997; SILVA, 2006; MONTOYA-LERMA et al., 2012; DELLA LUCIA, 2014;).

Diversos estudos buscam métodos alternativos de controle capazes de minimizar os prejuízos causados pelas formigas-cortadeiras, dentre eles estão o controle biológico, controle microbiológico e controle químico com compostos menos agressivos ao ambiente, como extratos vegetais por exemplo. Estudos básicos que investigam a morfologia externa e interna e os padrões comportamentais desses insetos podem contribuir para o entendimento dessa sociedade complexa, possibilitando discussões acerca do tema no meio científico e, até, o surgimento de novas estratégias de controle (BOARETTO; FORTI, 1997; DELLA-LUCIA, 2014; BRITTO et al., 2016).

1.1 Insetos sociais

Os insetos eussociais, como formigas, algumas vespas, cupins e abelhas apresentam castas reprodutivas e estéreis, sobreposição de gerações, divisão de trabalho e cuidado com a prole. Viver em sociedade favorece a luta pela sobrevivência, uma vez que facilita aspectos como a busca por alimento, cuidado com a prole e proteção do ninho. Em contrapartida, a vida em grupo favorece a disseminação de patógenos e, por isso, as formigas adquiriram diferentes mecanismos de defesa, inclusive alguns comportamentos que caracterizam a imunidade social. Na comunidade, cada indivíduo desempenha uma função específica em benefício da colônia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1971; SCHMIDT, 1986; CAETANO, 2002; MORGAN, 2008; OTTI et al., 2014; BACCARO et al., 2015).

As formigas-cortadeiras apresentam castas morfológicas, químicas, comportamentais e temporárias. As castas morfológicas são formadas por operárias polimórficas, mínima, média e grandes, divididas em castas comportamentais de acordo com as funções que desempenham. A casta química envolve sinais químicos emitidos entre os indivíduos da mesma colônia. A casta temporária é caracterizada, na maioria das vezes, quando a formiga mais jovem trabalha ao redor da formiga mais velha dentro do formigueiro. As colônias do gênero *Atta* podem chegar a uma população composta por milhões de indivíduos, em que as operárias mínimas são responsáveis pela manutenção do jardim de fungo, as médias e grandes fazem a coleta de material vegetal e protegem a colônia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; DELLA LUCIA, 2011).

A casta reprodutiva compreende as fêmeas aladas, conhecidas por rainhas ou iças, e os

machos alados denominados bitus. Durante um certo período, ambos deixam os formigueiros e acasalam no voo nupcial, também conhecido como revoada. As fêmeas aladas acasalam com 5 a 7 bitus, armazenando o líquido espermático na spermateca, assegurando a reposição de ovos durante a vida da colônia. No final da revoada, os bitus morrem e as iças retiram suas asas para assim começarem a cavar o solo para formação de um novo ninho (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

Quanto ao desenvolvimento, as formigas são insetos holometábolos, ou seja, possuem metamorfose completa e podem apresentar estágios de ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos podem ser brancos ou amarronzados; as larvas não possuem pernas e passam por 3 a 6 subestágios de desenvolvimento e o crescimento ocorre a cada troca do exoesqueleto. As larvas são totalmente dependentes das formigas adultas e são alimentadas na boca pelas operárias. Após o estágio larval, inicia-se o estágio de pupa, em que os indivíduos já apresentam aparência de formiga adulta, porém no início do estágio ainda são imóveis. É possível diferenciar três estágios de pupa: olho branco, rosa e preto. Após as fases imaturas, o indivíduo que completa a metamorfose é chamado de imago (BACCARO, 2015).

1.2 Relação de simbiose e composição do formigueiro

Todas as espécies da subtribo Attina cultivam no interior do formigueiro um jardim de fungo, mas apenas os gêneros *Atta*, *Acromyrmex* e *Amoimyrmex* cortam e incorporam material vegetal fresco para alimentar o fungo simbiote. A espécie *Atta sexdens* cultiva em seu ninho o fungo *Leucogaricus gongylophorus*, fonte alimentar da colônia. Para isso, adquiriram ao longo do tempo comportamentos de preparo do material vegetal a ser incorporado no jardim de fungo. As operárias médias e grandes saem em forrageio, coletam folhas e galhos e, com uso das peças bucais, preparam e incorporam o material sobre o jardim de fungo. Este fungo é capaz de incorporar nutrientes da biomassa vegetal para seu crescimento e, também, os disponibiliza para formigas (SCHULTZ, 1999; DINIZ; BUENO, 2009; DINIZ; BUENO, 2010; AYLWARD et al., 2013; CRISTIANO et al., 2020).

Além das formigas fornecerem ambiente úmido e substrato vegetal para o fungo, servindo de alimento para as larvas e parte da fonte alimentar dos adultos, o fungo também se beneficia por estar livre de outros fungos ou bactérias, porque as saúvas produzem compostos antibióticos, e as formigas se beneficiam porque o fungo quebra as enzimas que podem causar detoxificação de compostos secundários provenientes dos materiais vegetais (LITTLEDYKE;

CHERRETT, 1978; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; NORTH et al., 1997; NORTH et al., 1999; CURRIE; STUART, 2001; MUELLER, 2002).

Entre tantos animais, as formigas cultivadoras de fungo têm a mais complexa simbiose microbiana, porque tanto a formiga quanto o fungo apresentam uma abundante comunidade de microrganismos associados com funções nutricionais. Muitas bactérias estão presentes no trato digestivo das formigas, podendo ser responsáveis pela produção de antibióticos. A comunidade bacteriana difere entre os táxons das formigas, níveis tróficos e diferentes órgãos (RUSSELL et al., 2009; SEN et al., 2009; KELLNER et al., 2015; VIEIRA et al., 2017).

A ingestão de alimentos ocorre de forma variada nas diferentes castas da colônia. Segundo Fisher (1994), a estrutura conhecida como gongilídios, um micélio vegetativo do fungo simbiote, é a única fonte alimentar das larvas das formigas-cortadeiras e que, também, fornece 9% de energia para as operárias, sendo essas as responsáveis por manter o jardim de fungo sempre limpo. Ao realizar o corte das folhas, as operárias alimentam-se da seiva presente na planta, e não diretamente da colônia de fungo. A raspagem da superfície da folha para obtenção de nutrientes como forma de fonte alimentar, também é utilizada pelas operárias. Esse comportamento auxilia no processo de decomposição realizado pelo fungo (WEBER, 1966; FORTI; ANDRADE, 1999).

O ninho dessa espécie de formiga é constituído por câmaras subterrâneas, as quais são interligadas por túneis. No interior dessas câmaras há o jardim de fungo, bem como as larvas, pupas e formigas adultas. Algumas dessas câmaras são destinadas exclusivamente ao descarte de resíduos. Dentre esses resíduos encontram-se fragmentos de fungo velho, indivíduos mortos e fragmentos vegetais não incorporados. A construção dos ninhos aumenta a aeração e drenagem do solo, o que ajuda na fixação de raízes de espécies vegetais. Além disso, promove o acúmulo de matéria orgânica em decomposição nas câmaras de descarte, o que melhora a troca catiônica do solo (SILVA, 2006; LACERDA et al., 2014).

1.3 Aspectos morfológicos

Externamente, o corpo da formiga é revestido por uma fina e dura camada de quitina, que compõe seu exoesqueleto e exerce importante função de proteção contra impactos físicos, desidratação e o ataque de patógenos. A presença de exoesqueleto é considerado um fator favorável ao sucesso evolutivo dos insetos. Seu corpo é dividido em: cabeça, tórax, pedicelo e gáster. A cabeça é composta por um par de antenas, órgão com função sensorial; um par de

olhos; um par de mandíbulas desenvolvidas, responsáveis pela alimentação e proteção, que nas formigas-cortadeiras têm aspecto serrilhado. No toráx estão fundidos os três pares de pernas e as asas, presentes apenas nas castas reprodutivas (iça e bitu) (CAETANO et al., 2002).

A anatomia interna é alvo de diversos estudos científicos. O sistema circulatório das formigas é aberto, formado por um coração e uma aorta, ambos localizados dorsalmente no corpo. O fluido sanguíneo dos insetos é chamado hemolinfa e apresenta células, hemócitos, que participam das respostas imunológicas inatas (CAETANO et al., 2002).

No gáster são encontrados o sistema excretor, sacos aéreos, ramos da traquéia, parte do esôfago, ventrículo, íleo e reto, as quatro últimas estruturas constituem o sistema digestório. Dentre os componentes do sistema excretor, os túbulos de Malpighi constituem o órgão mais importante, já que desempenham a função de excretar o filtrado da hemolinfa transportando íons, como potássio, ácido úrico, amônia, entre outras substâncias até o reto e reabsorvendo outros essenciais à estrutura corporal. E, por isso, são responsáveis pela homeostase corporal. Localizados na parte posterior do corpo dos insetos, com filamentos longos, delgados e composto de fibras musculares, são inseridos entre a região do ventrículo e intestino posterior, mas especificamente no íleo (CHAPMAN, 1975; WIGGLESWORTH, 1974; GILLOTT, 1980; MELLO, 1979).

O principal órgão do sistema excretor dos insetos são os túbulos de Malpighi. Esses desempenham a função de reabsorção e secreção, colaborando na produção de urina primária e retirando material tóxico presente no corpo. Os túbulos são essenciais para estudo toxicológico em insetos, uma vez que respondem rapidamente às mudanças no ambiente (NOCELLI et al., 2016).

A quantidade de túbulos de Malpighi na fase adulta varia entre as diferentes castas; a rainha apresenta maior número, aproximadamente 34 túbulos, decrescendo até chegar nas operárias mínimas, com 8, sendo sempre múltiplos de 2. Em sua fase larval, os túbulos de Malpighi já são aparentes, logo no início do desenvolvimento do embrião (CAETANO, 1990; CAETANO, 1994; CAETANO et al. 2002).

Nos insetos, à medida que os estágios larvais sucedem, os túbulos de Malpighi passam por transformações, crescendo em tamanho ou ocorrendo a produção de novos túbulos, para ter capacidade de suprir as necessidades do indivíduo. Morfologicamente, os túbulos consistem em uma única camada de células, podendo apresentar um único tipo de célula ou mais. As células presentes são cúbicas ou piramidais, com núcleos dispostos no centro ou na

periferia, cada um incluindo de 1 a 3 nucléolos e ambas com grânulos mineralizados no citoplasma em diferentes estágios de desenvolvimento (NOCELLI, 2016; POIANI, 2020).

Em muitos insetos, os túbulos de Malpighi são divididos em três regiões, a proximal, intermediária e distal, compostas por células distais. Cada região é responsável por funções específicas na filtração da hemolinfa e na formação da urina primária, passando por todas as regiões do túbulo. Há indícios que a região distal está responsável pela filtração dos fluidos corporais e a região proximal pela reabsorção de íons e água (BERRIDGE; OSCHAMANN, 1972; CRUZ-LANDIM, 1998).

Sabe-se que, nesta espécie de formiga, nas fases larvais não está presente o intestino posterior e que os túbulos de Malpighi, presentes na larva, sofrem regressão durante os processos de metamorfose e são substituídos durante a formação da pupa de olho escuro. Investigar a morfologia dos túbulos de Malpighi e as modificações que ocorrem em seu estabelecimento durante a metamorfose pode contribuir para o esclarecimento de sua função nos diferentes estágios de desenvolvimento das formigas-cortadeiras.

2 OBJETIVO

Caracterizar morfologicamente, a partir de microscopia óptica e eletrônica de varredura, os túbulos de Malpighi de *Atta sexdens* nos diferentes estágios de desenvolvimento pós embrionário: larva, pupa de olho escuro e imago adulto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Larvas, pupas e operárias médias de *Atta sexdens* foram coletadas de ninhos artificiais mantidos no Laboratório de Formigas-cortadeiras do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro - UNESP, no total foram coletadas 55 formigas de cada fase de desenvolvimento. As colônias são alimentadas diariamente com folhas de *Eucalyptus* sp., *Hibiscus* sp., *Mangifera indica* e aveia e mantidas em sala

climatizada com temperatura entre 24 e 25°C.

Após a coleta, as formigas nas diferentes fases do desenvolvimento tiveram seu gáster dissecado, com auxílio de pinças e alfinetes entomológicos, em solução salina 0,06% sob estereomicroscópio Leica EZ4 para retirada dos túbulos de Malpighi. As peças foram mantidas em solução salina após a dissecção e destinadas às etapas de preparação do material para análise morfológica a partir de microscopia óptica e eletrônica de varredura.

3.2 Registro fotográfico através do estereomicroscópio

Os túbulos de Malpighi dissecados dos três grupos experimentais (larva, pupa de olho escuro e imago adulto) foram transferidos para lâminas de vidro a fim de serem fotodocumentados sob estereomicroscópio Leica EZA. As fotografias foram obtidas com câmera comum posicionada na lente ocular do equipamento. Em alguns casos, foi necessária a introdução de gotas do corante Azul de Metileno para facilitar a visualização e manuseio da peça. A utilização do corante foi essencial para melhor observação do material desejado, já que os túbulos de Malpighi das larvas e pupas são translúcidos e, portanto, de difícil visualização.

3.3 Análise histológica e microtomia

Após a dissecção, os túbulos de Malpighi dos três grupos experimentais foram mantidos em fixador paraformaldeído 4% por sete dias. A fixação é uma importante etapa para que o órgão obtenha maior resistência nas próximas etapas, sendo que os fixadores químicos utilizados ajudam a evitar a degradação e a conservar a morfologia (MONTANARI, 2016).

Posteriormente, o material foi desidratado em uma sequência de banhos com concentrações crescentes de álcool: 30%, 50%, 70%, 85%, 90% e 95%, substituídos no intervalo de duas horas. Essa etapa tem a finalidade de eliminar a água presente no tecido e, assim, facilitar a penetração da resina. A etapa seguinte é a inclusão. Nesse processo o material foi infiltrado com substâncias que proporcionam o aspecto rígido, e revestido pela resina que possibilita a etapa de microtomia (GITIRANA, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO,

2013).

A etapa de microtomia realiza cortes finos de 3-6 μm na resina contendo o material de estudo, o que permite melhor observação ao microscópio. Os cortes foram feitos em micrótomo LEICA RM 2255 e recolhidos em lâminas de vidro. As lâminas foram coradas utilizando-se os corantes hematoxilina-eosina, para isso foram mantidas em hematoxilina de Harris por dez minutos, lavadas em água corrente por cinco minutos, mantidas por cinco minutos em eosina aquosa e lavadas em água corrente. Após secas ao ar livre, as lâminas foram submersas em xilol e, em seguida, revestidas com bálsamo do Canadá sintético e lamínula (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

3.4 Técnica de Microscopia Eletrônica de varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura também foi utilizada na caracterização dos túbulos de Malpighi. Para isso, as peças foram fixadas em Karnovsky (paraformaldeído a 2%, glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4) por uma hora, lavadas em água destilada e desidratadas em série crescente de álcool e secos em temperatura ambiente. O material foi fixado com fita adesiva em estruturas metálicas (stub) e revestidas com ouro por Sputtering Balzer SCD 050. Feito isso, o material foi analisado e fotografado com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura Philips. As fotomicrografias obtidas nas duas técnicas de microscopia foram utilizadas para comparação dos túbulos de Malpighi nos diferentes grupos amostrais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

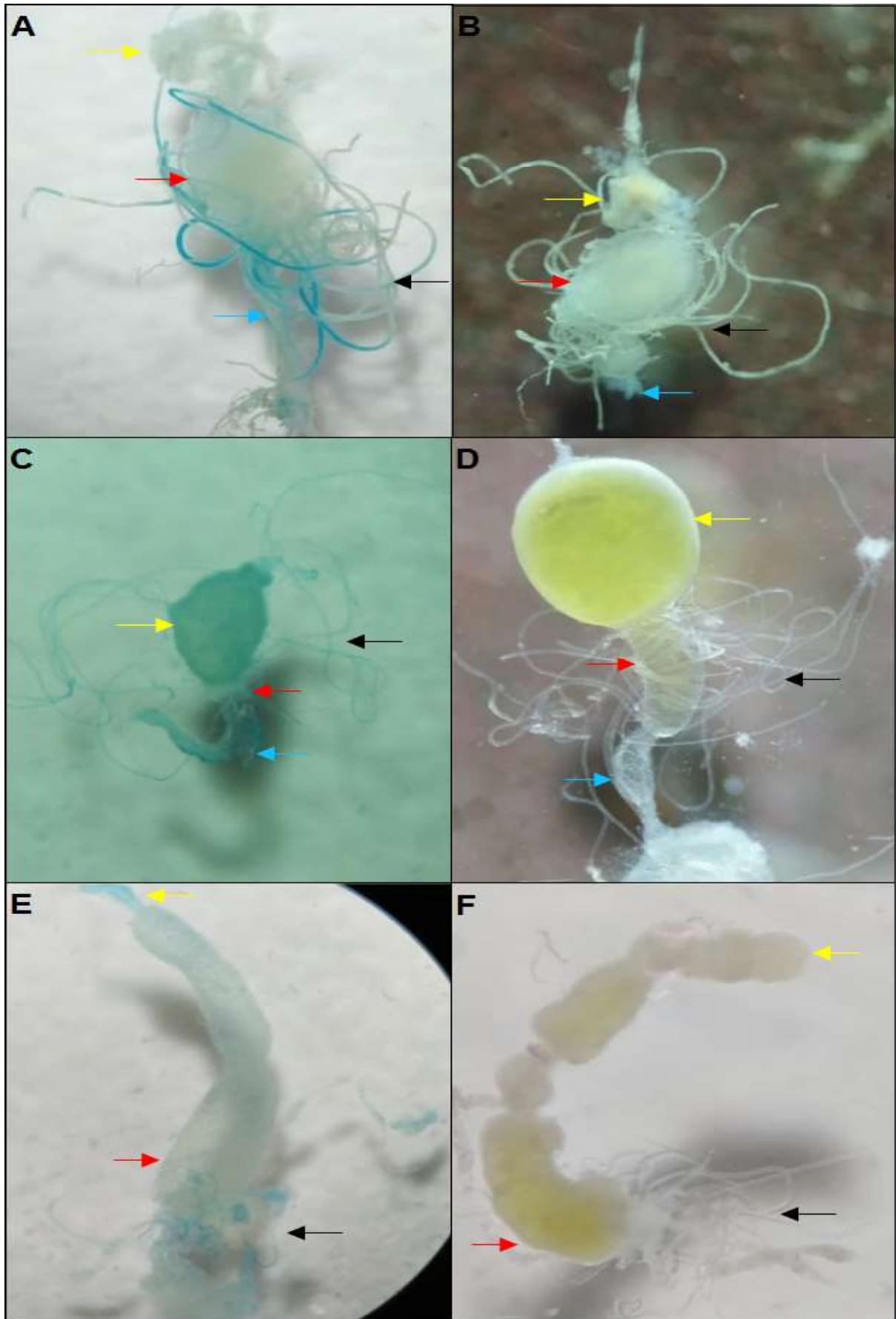
As técnicas histológicas propostas na presente pesquisa possibilitaram manusear os diferentes estágios de desenvolvimento da formiga-cortadeira *A. sexdens*, larva, pupa de olho escuro, e reconhecer as diferenças na morfologia externa e interna dos diferentes grupos. As larvas submetidas à dissecação possuem coloração entre branco e bege claro; já as pupas, coloração branca com olhos marrons escuro, nesse estágio já apresentam os três pares de pernas inseridos na região do tórax; os imagos adultos, apresentam coloração marrom claro e tegumento mais rígido em relação aos outros grupos. Abaixo estão descritos os resultados encontrados acerca da morfologia interna dos órgãos do sistema digestório dessa espécie de

formiga, com detalhe para o órgão alvo desta pesquisa: os túbulos de Malpighi.

4.1 Fotografia sob estereomicroscópio

Após a dissecação do gáster, foi possível visualizar órgãos do sistema digestório da formiga, além de tecidos acessórios como a ramificação de traqueias, células do corpo gorduroso e sacos aéreos. Para análise mais detalhada dos túbulos de Malpighi, as peças foram limpas e removidas do gáster com auxílio de pinças entomológicas. A Figura 1 ilustra os túbulos de Malpighi inseridos ao ventrículo (intestino médio), mas especificamente no íleo, além do papo e reto. As peças mostradas nas imagens A, C e E foram coradas anteriormente com uso do corante Azul de Metileno, para facilitar a visualização.

Figura 1 - Fotografias sob estereomicroscópio dos túbulos de Malpighi nos três estágios de desenvolvimento de *A. sexdens*. A e B: tubo digestório e túbulos de Malpighi de imago adulto com e sem coloração, respectivamente; C e D: tubo digestório e túbulos de Malpighi de pupa de olho escuro com e sem coloração, respectivamente; E e F: tubo digestório e túbulos de Malpighi de larva com e sem coloração, respectivamente. Setas amarelas: papo; setas vermelhas: ventrículo; setas pretas: túbulos de Malpighi; setas azuis: íleo e reto.



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

O principal órgão do sistema excretor de *A. sexdens* consiste em túbulos longos e delgados que se espalham pela cavidade do gáster e sua espessura varia entre os estágios de desenvolvimento. Os túbulos de Malpighi estão localizados na parte posterior do ventrículo: nas pupas e imagos adultos os túbulos estão inseridos no início do íleo (Figura 1 - A a D); nas larvas não estão presentes o íleo e o reto (intestino posterior) e, portanto, os túbulos de Malpighi são a parte mais distal do tubo digestório deste estágio de desenvolvimento (Figura 1 - E e F). Na pupa observamos grande acúmulo de substâncias no papo (Figura 1 - D). Visualmente, os túbulos de Malpighi dos imagos adultos são mais espessos, quando comparados aos outros grupos experimentais, enquanto que os túbulos da pupa são mais longos se comparados aos demais, nas larvas os túbulos são curtos e mais translúcidos. Outros métodos de análise são necessários para concluir acerca da espessura ou comprimento dos túbulos de Malpighi.

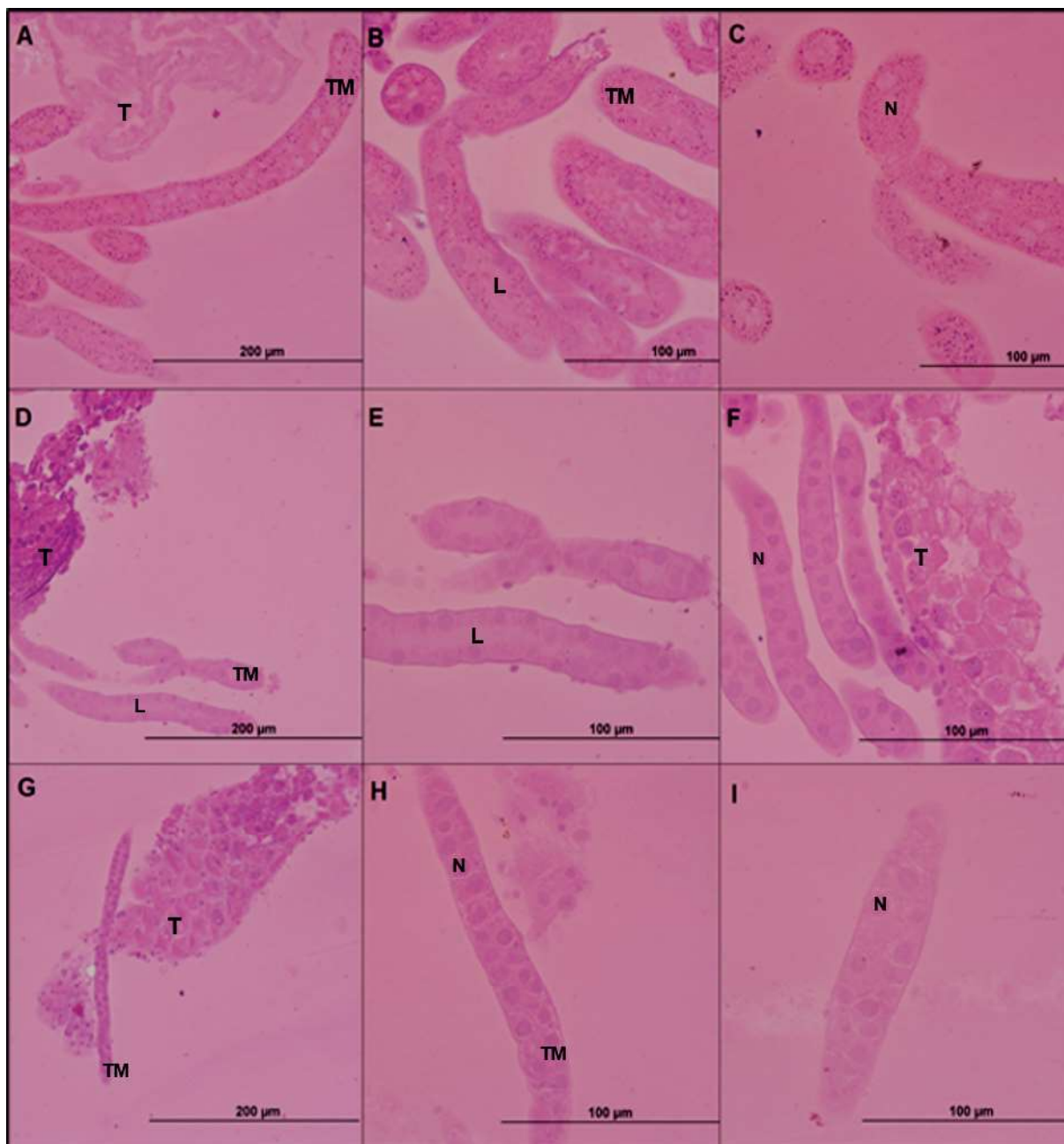
Notou-se que o número de túbulos do sistema excretor varia de acordo com a fase de desenvolvimento em que se encontra a formiga. No imago adulto, estão presentes, aproximadamente, 14 túbulos, na pupa de olho escuro, aproximadamente, 12 túbulos e na larva, aproximadamente, 8 túbulos, a diferença pode estar relacionada com a maior demanda em filtrar a hemolinfa. Caetano (1984) verificou variação no número dos túbulos em formigas do gênero *Atta* em castas diferentes, em que os soldados apresentam 16 túbulos, e as operárias mínimas apenas 6 túbulos.

Em abelhas da espécie *Apis mellifera adansonii* o número de túbulos também varia nas diferentes fases do desenvolvimento, a larva apresenta apenas quatro túbulos, enquanto que nas operárias adultas o número de túbulos pode chegar a 64. Em outros insetos, como o pernilongo *Aedes aegypti*, os cinco túbulos presentes na fêmea são maiores que os presentes no macho, o que explica sua maior capacidade de secretar fluídos. Nos coleópteros a disposição dos túbulos são diferentes em relação às formigas-cortadeiras, nas larvas os túbulos estão localizados anteriormente sobre o intestino posterior, com sua parte distal disposta no cólon. São 6 túbulos simples, longos e sem ramificações, organizados em dois grupos, cada grupo contendo 3 (CRUZ-LANDIM & MELO, 1981; SILVA, 1975; PLAWNER et al., 1991).

4.2 Microscopia óptica - técnica HE

As lâminas histológicas contendo os túbulos de Malpighi das diferentes fases de desenvolvimento da *A. sexdens* foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico de luz LEICA DM750. Essa etapa metodológica possibilitou observar a organização tecidual dos túbulos de Malpighi e comparar os aspectos histológicos nas diferentes fases do desenvolvimento (Figura 2).

Figura 2 - Fotomicrografias dos túbulos de Malpighi de diferentes estágios de desenvolvimento de *Atta sexdens*. A, B e C: imago adulto; D, E e F: pupa de olho escuro; G, H e I: larva. Legenda: TM: túbulos de Malpighi; n: núcleo; l: lúmen; t: tecido adjacentes do ventrículo ou corpo gorduroso. A - 200x (A, D e G); 400x (B, C, E, F, I e J).



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

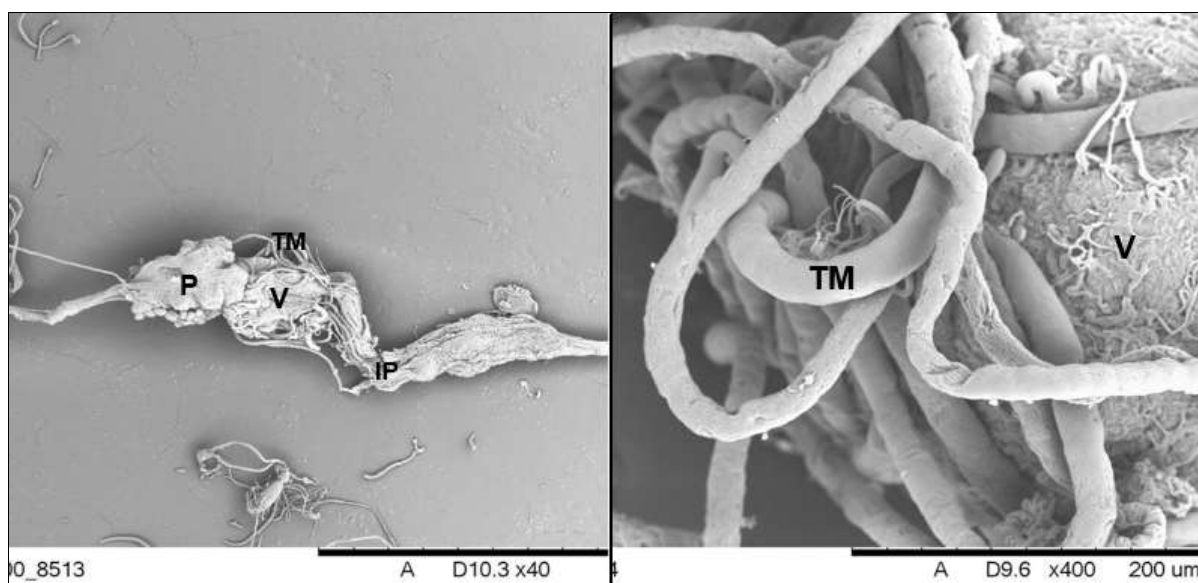
Na Figura 2 é possível analisar as diferenças na disposição das células dos túbulos de Malpighi das diferentes fases de desenvolvimento da *A. sexdens*. Em todos os grupos, as células dos túbulos apresentam formato cúbico e grande núcleo central. No imago adulto e na

pupa as células estão dispostas mais para a periferia do órgão (Figura 2 - A a F), sendo que na pupa o lúmen é bastante visível (Figura 2 - E). Em todas as lâminas do grupo experimental larva, notou-se maior número de núcleos corados e em maior tamanho (Figura 2 - G a I), o que pode ser devido à altura do corte durante a microtomia, mas que também pode ser característica morfológica deste grupo, podendo estar relacionado à maior atividade metabólica de excreção. Segundo Arabe e Caetano (2002), os insetos contém túbulos de Malpighi com suas células dispostas em uma única camada, podendo ser de um ou diversos tipos, ao redor do lúmen.

4.3 Microscopia eletrônica de varredura

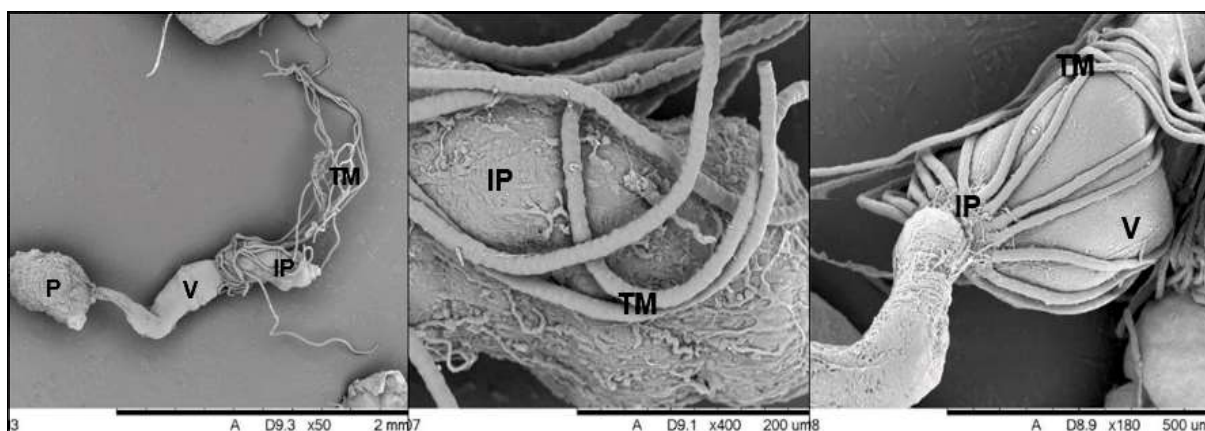
Fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura Philips, possibilitaram verificar o local de inserção dos túbulos de Malpighi nos diferentes grupos experimentais, além de ajudar na compreensão da morfologia interna do tubo digestório de *A. sexdens*.

Figura 3 - Fotomicrografia dos túbulos de Malpighi dos adultos de *A. sexdens*. Legenda: TM: túbulos de Malpighi; P: papo; V: ventrículo; IP: intestino posterior (íleo e reto).



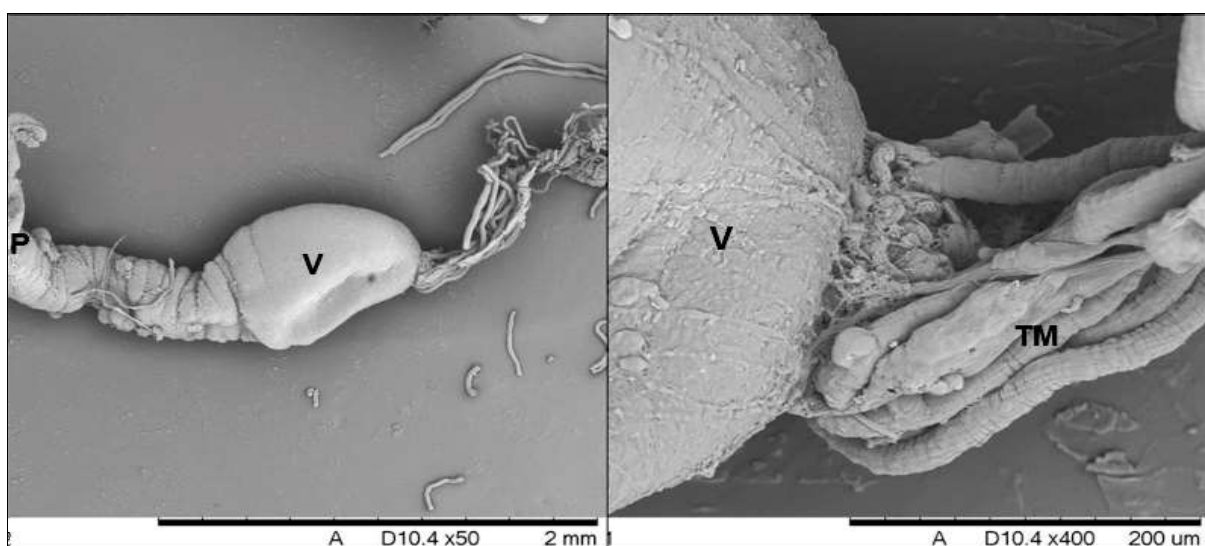
Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Figura 4 - Fotomicrografia dos túbulos de Malpighi das pupas de olho escuro de *A. sexdens*. Legenda: TM: túbulos de Malpighi; P: papo; V: ventrículo; IP: intestino posterior (íleo e reto).



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Figura 5 - Fotomicrografia dos túbulos de Malpighi da fase larval de *A. sexdens*. Legenda: TM: túbulos de Malpighi; P: papo; V: ventrículo.



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

As peças utilizadas nesta etapa metodológica sofreram alguns danos durante o processamento, como perda de parte do material e agregação dos túbulos de Malpighi. Ainda assim, foi possível observar a inserção do sistema excretor nos diferentes grupos analisados,

no imago adulto e na pupa os túbulos se inserem ao final do ventrículo (intestino médio) e se espalham aderidos nos demais órgãos (Figura 3 e 4), enquanto que na larva, como o intestino posterior não está presente, os túbulos localizam-se na parte mais distal do tubo digestório e são mais curtos. Após a fase larvária, os túbulos aparecem como evaginações da parede do íleo. Nessa região há a presença de colágeno, favorecendo uma maior resistência e flexibilidade para os túbulos movimentarem na hemolinfa sem que haja ruptura na região. Percebe-se que a literatura que descreve a morfologia interna de insetos não é recente, poucos estudos têm abordado o tema atualmente, em especial com formigas-cortadeiras. Ainda pouco se sabe acerca da função dos túbulos de Malpighi nas fases iniciais do desenvolvimento e tampouco sobre a reorganização tecidual deste órgão durante o processo de metamorfose (WHEELER, 1926; JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983; LEHNINGER et al., 1993).

5 CONCLUSÃO

As técnicas histológicas exploradas na presente pesquisa possibilitaram descrever e comparar a morfologia interna do órgão do sistema excretor, os túbulos de Malpighi, da formiga-cortadeira *A. sexdens* nas diferentes fases do desenvolvimento: larva, pupa de olho escuro e imago adulto. As formigas, assim como os demais holometábolos, sofrem metamorfose completa durante o desenvolvimento e, sabe-se que os processos de metamorfose alteram a morfologia interna e externa dos insetos. Neste estudo, verificou-se que o intestino posterior (íleo e reto) está ausente na fase larvária e presente nas fases de pupa e imago adulto, em que é o local de inserção dos túbulos de Malpighi. O número de túbulos e aspectos morfológicos do sistema excretor variam nas diferentes fases de desenvolvimento que foram avaliadas.

As técnicas utilizadas não são conclusivas quanto às funções e reorganização tecidual deste órgão durante o desenvolvimento e, mais estudos são necessários para comparar a funcionalidade dos túbulos de Malpighi nas diferentes fases. Estudos basais de análise morfológica são escassos atualmente e, além de possibilitar a compreensão da morfologia interna destes insetos, podem auxiliar em pesquisas sobre a fisiologia e as estratégias nutricionais das formigas-cortadeiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAB, A., & CAETANO, F. H. **Segmental specializations in the Malpighian tubules of the fire ant *Solenopsis saevissima* Forel 1904 (Myrmicinae): an electron microscopical study.** *Arthropod Structure & Development*, v. 30, n. 4, p. 281-292, 2002.
- AYLWARD, F.; BURNUM-JOHNSON, K.; TRINGE, S.; TEILING, C.; TREMMEL, D.; MOELLER, J.; SCOTT, J.; BARRY, K.; PIEHOWSKI, P.; NICORA, C.; Malfatti, S.; MONROE, M.; PURVINE, S.; GOODWIN, L.; SMITH, R.; WEINSTOCK, G.; GERARDO, N.; SUEN, G.; LIPTON, M.; CURRIE, C. ***Leucoagaricus gongylophorus* Produces Diverse Enzymes for the Degradation of Recalcitrant Plant Polymers in Leaf-Cutter Ant Fungus Gardens.** Disponível em: <https://aem.asm.org/content/aem/79/12/3770.full.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2019.
- BACCARO, F. B.; FEITOSA, R. M.; FERNÁNDEZ, F.; FERNANDES, I. O.; IZZO, T. J.; SOUZA, L. P.; SOLAR, R. **Guia para gêneros de formigas no Brasil.** Manaus: INPA, 2015. E-book. Disponível em: https://ppbio.inpa.gov.br/sites/default/files/Livro_Formigas_2015.pdf. Acesso em: 29 jul. 2019.
- BERRIDGE, M.J.; OSCHMANN, J.L. **Transporting epithelia.** 1ed. New York: Academic Press, p.190, 1972.
- BOARETTO, M.; FORTI, L. **Perspectivas no controle de formigas-cortadeiras.** Série Técnica IPEF, Botucatu, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.
- BOLTON, B. **AntCat:** An online catalog of the ants of the world. Disponível em: <http://antcat.org>. Acesso em: 23 ago. 2019.
- BRITTO, J.; FORTI, L.; OLIVEIRA, M.; ZANETTI, R.; WILCKEN, C.; ZANUNCIO, J.; LOECK, A. et al. **Use of Alternatives to PFOS, Its Salts and PFOSF for the Control of Leaf-Cutting Ants *Atta* and *Acromyrmex*.** *Intern. Journal of Reserch in Environ. Studies* n. 3, p. 11-92, 2016.
- CAETANO, F. H. **Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae).** *Papéis avulsos de zoologia (São Paulo)*, v. 35, n. 23, 1984.
- CAETANO, F. H. **Morphology of the digestive tract and associated excretory organs of ants.** *Applied myrmecology. A world perspective*, p. 119-129, 1990.
- CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F. J. **Formigas: biologia e anatomia.** Rio Claro: Topázio, 2002.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects: structure and function.** New York: American Elsevier, p. 819, 1975.
- CRISTIANO, Maykon et al. ***Amoimyrmex Cristiano, Cardoso & Sandoval*, gen. nov. (Hymenoptera: Formicidae): a new genus of leaf-cutting ants revealed by multilocus molecular phylogenetic and morphological analyses.** *Austral Entomology*, v. 59, n. 4, p. 643-676, 2020.
- CRUZ-LANDIM, C. & MELO, R.A. **Desenvolvimento e Envelhecimento de larvas e adultos de *Scaptotrigona postica* latreille (Hymenoptera, Apidae): aspectos histológicos e histoquímicos.** São Paulo: ACIESP, n.31, p.118, 1981.

- CRUZ-LANDIM, C. **Specializations of the Malpighi Tubules cells in a stingless bee, *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae).** Acta Micros. Caracas, v. 7, n. 2, p. 26-33, 1998.
- CURRIE, C.; STUART, A. **Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants.** The Royal Society, v. 268, n. 1471, p. 1033-1039, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2001.1605>.
- DA SILVA, I. **Morfologia do tubo digestivo da larva de *Oncideres saga saga* (Dalman, 1823)(Coleoptera, Cerambycidae).** Acta Biologica Paranaense, v. 4, 1975.
- DELLA LUCIA, T. **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo.** Viçosa: UFV, 2011.
- DELLA LUCIA, T.; GANDRAB, L.; GUEDES, R. **Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges.** Pest Management, v. 70, n. 1, p. 14-23, 2014.
- DINIZ, E.A.; BUENO, O.C. **Substrate Preparation Behaviors for the Cultivation of the Symbiotic Fungus in Leaf-Cutting Ants of the Genus *Atta* (Hymenoptera: Formicidae).** Sociobiology, v. 53, n. 2, p. 1-16, 2009.
- DINIZ, E.A.; BUENO, O.C. **Evolution of Substrate Preparation Behaviors for Cultivation of Symbiotic Fungus in Attine Ants (Hymenoptera: Formicidae).** J InsectBehav. v. 23, p. 205-214, 2010.
- FISHER, P. J.; STRADLING, D. J.; PEGLER, D. N. **Leaf cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*.** Mycologist, v. 8, n. 3, p. 128-131, 1994.
- FORTI, L.; ANDRADE, APP de. **Ingestão de líquidos por *Atta sexdens* (L.)(Hymenoptera, Formicidae) durante a atividade forrageira e na preparação do substrato em condições de laboratório.** Naturalia, v. 24, p. 61-63, 1999.
- GILLOTT, C. **Entomology.** New York: Plenum, 1980, 729 p.
- GITIRANA, L. **Histologia: Conceitos Básicos dos Tecidos.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.
- GULLAN, P. J. & CRANSTON, P. S. **The insects: an outline of Entomology.** Oxford: Blackwell Science, 2000. 470 p.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants.** Berlin: Springer-Verlag, 1990.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: texto e atlas.** 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- JUNQUEIRA, L.C.U., JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia.** São Paulo: Editora Santos, 1983, p.48-81.
- KELLNER, K.; ISHAK, H.; LINKSVAYER, T.; MUELLER, U. **Bacterial community composition and diversity in an ancestral ant fungus symbiosis.** FEMS microbiology ecology, v. 91, n. 7, p. 73, 2015
- LACERDA, F. G.; DELLA LUCIA, T. M. C.; DE SOUZA, O.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; DE SOUZA, L. M.; COUCEIRO, J. C.; DE SOUZA, D. J. **Social interactions between fungus garden and external workers of *Atta sexdens* (Linnaeus) (Hymenoptera: Formicidae).** Italian Journal of Zoology, v. 81, n. 2, p. 298-303, 2014.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry.** 2nd ed.; Worth: New York, 1993.

LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. **Defense mechanisms in young and old leaves against cutting by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae).** B. of Entomol. Research, v. 68, n. 2, p. 263-270, 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007485300007343>.

MADDRELL, S. H. et al. **5-Hydroxytryptamine: a second diuretic hormone in *Rhodnius prolixus*.** Journal of Experimental Biology, v. 172, p. 417-429, 1991.

MELLO, M. L. S. **A mucous secretion in the Malpighian tubes, of a neotropical bumblebee, *Bombus atratus* Franklin.** Protoplasma, v. 99, p. 147-158, 1979.

MONTANARI, T. **Histologia:** Texto, atlas e roteiro de aulas práticas. Porto Alegre: Edição do autor, 2016. E-book. Disponível em: <file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/001002350.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2019.

MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.; ARMBRECHT, I.; FARJI-BRENER, A.; CALLE, Z. **Leaf-cutting ants revisited: towards rational management and control.** Int J Pest Management, v. 53, n. 3, p. 225-247, 2012.

MORGAN, D.E. **Chemical sorcery for sociality: exocrine secretions of ants (Hymenoptera: Formicidae).** Myrmecol. News, v. 11, p. 79-90, 2008.

MUELLER, U. **Ant versus fungus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attini ant-fungus symbiosis.** The American Naturalist, v. 160, n. S4, p. 67-98, 2002. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)87381-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(97)87381-8).

NOCELLI, Roberta CF et al. Comparative physiology of Malpighian tubules: form and function. **Open Access Insect Physiology**, v. 6, p. 13-23, 2016.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão.** São Paulo: Nogueirapis, p. 33-38, 1997.

NORTH, R.; JACKSON, C.; HOWSE, P. **Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants.** Trends in Ecol. & Evol., v. 12, n. 10, p. 386-389, 1997.

NORTH, R.; JACKSON, C.; HOWSE, P. **Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate for the fungus.** Physiol Entomology, Oxford, v. 24, n. 2, p. 127-133, 1999.

PERFECT, I.; VANDERMEER, J. **Distribution and turnover rate of a population of *Atta cephalotes* in a tropical rain forest in Costa Rica.** Biotropica, v. 25, n. 3, p. 316-321, 1993.

PLAWNER, L.; PANNABECKER, T.; LAUFER, S.; BAUSTIAN, M.; BEYENBACH, K. **Control of diuresis in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: evidence for similar mechanisms in the male and female.** Insect Physiol. 119-128, 1991.

POIANI, S.; PEREIRA, M.; BUENO, O. **Transmission Electron Microscopy as a Tool to Study the Toxicological Effects of Thiamethoxam in Workers of *Atta sexdens* (Myrmicinae, Attini).** Microscopy and Microanalysis, p. 1-17, 2020.

RUSSELL, J.; MOREAU, C.; GOLDMAN-HUERTAS, B.; FUJIWARA, M.; LOHMAN, D.; PIERCE, N. **Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants.** Proc. of the Nat. Acad. of Sci., v. 106, n. 50, p. 21236-21241, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0907926106>.

SEN, R.; ISHAK, H.; ESTRADA, D.; DOWD, S.; HONG, E.; MUELLER, U. **Generalized antifungal activity and screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants.** National Academy of Sciences, v. 9, n. 106, p. 17805-17810, 2009.

SILVA, A. **Implantação da meliponicultura e etnobiologia de abelhas sem ferrão (*Melipona*) em comunidades indígenas no estado do Amazonas.** 2006. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

SCHMIDT, J.O. **Chemistry, pharmacology, and chemical ecology of ant venoms.** In: PIEK, T. *Venoms of the Hymenoptera: biochemical, pharmacological and behavioral aspects.* Orlando: Academic Press, 1986, p. 425-498.

SCHULTZ, T.R. **Ants, plants, and antibiotics.** *Nature*, v. 398 p. 747–748, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/19619>. Acesso em: 03 set. 2019.

TRIPLEHORN, C. A. & JOHNSON, N. J. **Borror and DeLong's introduction to the study of insects.** Belmont: Thomson Brooks/Cole, p. 660, 2005.

VIEIRA, A. S.; RAMALHO, M. O.; MARTINS, C.; MARTINS, V. G.; BUENO, O. C. **Microbial communities in different tissues of *Atta sexdens rubropilosa* leaf-cutting ants.** *Current Microbiol.*, v. 74, n. 10, p. 1216-1225, 2017.

WARD, P. S., **AntWeb:** Ants of California. Disponível em: <https://www.antweb.org/>. Acesso em: 27 ago. 2020.

WARD, P. S., BRADY, S. G., FISHER, B. L. & SCHULTZ, T. R. **The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae).** *Systematic Entomology*, v. 40, n. 1, p. 61-81., 2014.

WEBER, N. **Fungus-growing ants.** *Science*, v. 153, n. 3736, p. 587-604, 1966.

WHEELER, W.N. **Ants, their structure, development and behavior.** Columbia University, New York. 1926

WIGGLESWORTH, V. B. **The principles of insects physiology.** 7ed. London: Chapman and Hall, p. 827, 1974.

WILSON, E. **The insect societies.** Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press, p. 548, 1971.



Prof. Dr. Odair Correa Bueno
(Orientador)



Ma. Mayara Cristina Pereira
(Co-orientadora)



Marília Soccá da Silva
(Aluna)