
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ZOOLOGIA

Análise comparativa das glândulas pós-faríngeas e
sua participação na utilização de lipídeos pelas
formigas (Hymenoptera: Formicidae)

CARLOS MASSURETTI DE JESUS

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências
Biológicas (Zoologia)

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Março - 2012

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ZOOLOGIA

Análise comparativa das glândulas pós-faríngeas e
sua participação na utilização de lipídeos pelas
formigas (Hymenoptera: Formicidae)

CARLOS MASSURETTI DE JESUS

Orientador: Prof^o Dr. Odair Correa Bueno

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia)

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Março - 2012

“Não tenho medo nem de chuvas tempestivas nem de grandes ventanias soltas, pois eu também sou o escuro da noite”

Clarice Lispector

“Pra onde vão os trens, meu pai ? Para Mahal, Tami, para Camiri, espaços no mapa, e depois o pai ria: também pra lugar nenhum, meu filho, tu podes ir e ainda que se mova o trem tu não te moves de ti”

Hilda Hilst

Aos meus pais, **Carlos de Jesus** e **Stela Massuretti de Jesus**, por me amarem incondicionalmente, terem me ajudado a conquistar mais um sonho e por acreditarem em mim

Dedico este trabalho

Saibam que tudo o que eu fizer nesta vida será reflexo do pouco que vocês acham que fizeram por mim, mas que na verdade foi muito mais do que qualquer filho no mundo poderia querer. Vocês me deram praticamente tudo e vão estar para sempre em tudo que eu fizer

Às minhas irmãs **Ana Lúcia, Eliane e Cristina**, pelo cuidado que sempre tiveram comigo, por ajudarem a enxergar os meus erros e pela contribuição na formação do meu caráter

Ofereço

Amo vocês até o infinito

AGRADECIMENTOS

- Às inúmeras “formiguinhas” que tiveram suas vidas suprimidas para que eu pudesse aprimorar, desenvolver e divulgar os meus conhecimentos científicos.

- Ao ilustríssimo Prof^o Dr. Odair Correa Bueno, por todos os ensinamentos e disposição oferecidos durante quase 13 anos, mas principalmente, pela paciência e compreensão das minhas dificuldades e erros. Confio a ti toda minha estima, carinho, respeito e admiração pelo resto da vida.

- Agradecimento especial à  (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste trabalho (Processo: 2007/03424-5).

- À Prof^a Dra Neusa de Lima Nogueira do Laboratório de Histopatologia Vegetal (USP - ESALq – CENA) pelo tratamento diferenciado e por permitir total acesso aos laboratórios do CENA, mas principalmente, pela doçura e disposição.

- Agradeço também de modo muito especial à Antônio Teruyoshi Yabuki e Mônica Lanzoni Rossi que foram pessoas fundamentais na realização e processamento dos experimentos envolvendo a microscopia de luz e eletrônica, sem os quais este trabalho não teria sido realizado, mas principalmente, por toda a disposição, dedicação e amizade.

- Aos pesquisadores filiados ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) que auxiliaram na obtenção e tratamento dos radioisótopos, em especial a Gilberto Ribeiro Furlan.

- Às Biólogas Itamar Cristina Reiss, Amanda Carlos e Marcela Ceccato, os meus amores, por toda a ajuda que sempre me deram, mas principalmente, pelo carinho e amizade durante todos estes anos. Gosto muito de vocês.

- Aos amigos Eduardo Gonçalves Paterson Fox e Daniel Russ Solis pelas risadas compartilhadas, ajuda, amizade e força que sempre me ofereceram.

- À Nadia Aline Corroqué pelos comentários pertinentes feitos a este trabalho e, especialmente, pela doçura, disposição, amizade e amor oferecidos incondicionalmente.

- À Paula Cristiane Strina Juliasz “por ter pegado o metrô antes da hora” e ter me apresentado ao “tu não te moves de ti”, mas principalmente, por todo carinho, cuidado, amizade e amor oferecidos de longa data.

- Aos irmãos que este universo meu deu, Felipe Ferreira Joaquim e Daniel Angi por tornarem minha vida mais feliz, pela amizade e, principalmente, pelo amor e respeito que me tem.

- A todos amigos e amigas do Centro de Estudos de Insetos Sociais Unesp-Rio Claro pela convivência fantástica durante todos estes anos.

- À Necis Miranda de Lima e Lucilene Amaro da Silva pelo auxílio prestado durante todo este tempo e pela convivência mais que agradável.

- Aos pesquisadores do Centro de Estudos de Insetos Sociais Unesp-Rio Claro que com muito trabalho, dedicação e esforço tornaram possível a realização deste trabalho.

- À todas as pessoas que fazem parte da seção de pós-graduação do Instituto de Biociências da Unesp-Rio Claro, em especial à Rute Maria Raiss.

- Às pessoas que não foram citadas aqui, mas que estão na minha vida, e são extremamente importantes por me fazerem feliz, simples e muito melhor.

Sumário

1. Resumo	1
2. Abstract.....	2
3. Introdução.....	3
4. Justificativa e objetivos	6
5. Revisão de literatura	7
5.1. Evolução da alimentação nos himenópteros.....	7
5.2. Padrão alimentar	8
5.3. Ingestão do alimento.....	9
5.4. Distribuição e utilização dos alimentos entre os indivíduos da colônia	10
5.5. Sistema digestório	13
5.6. Glândulas pós-faríngeas (GPF)	15
5.7. Utilização do ácido oléico.....	19
5.8. Autorradiografia	19
5.8.1. Histórico	19
5.8.2. A técnica de autorradiografia.....	21
5.8.3. A formação da imagem.....	22
5.8.4. Aplicações	22
5.8.5. Características do marcador	23
6. Material e métodos	25
6.1. As espécies de formigas	25
6.2. Bioensaios	26
6.2.1. Aplicação das dietas	26
6.3. Dissecção das glândulas pós-faríngeas	27
6.4. Preparo para microscopia	28
6.4.1. Microscopia de luz - Controle.....	28
6.4.2. Preparo para microscopia eletrônica de transmissão (MET)	29
6.4.3. Preparo para microscopia eletrônica de varredura (MEV)	30
6.5. Corantes vitais	30
6.6. Autorradiografia	31
6.6.1. Marcadores radioativos.....	31
6.7. Preparo da autorradiografia para microscopia	32
6.7.1. Autorradiografia para microscopia de luz	33

6.7.2. Autorradiografia para microscopia eletrônica de transmissão	35
7. Resultados.....	39
7.1. Morfologia das glândulas pós-faríngeas (GPF)	39
7.1.2. Estereomicroscopia e microscopia eletrônica de varredura	39
<i>Atta laevigata</i>	39
<i>Camponotus vittatus</i>	44
<i>Pachycondyla villosa</i>	51
7.1.3. Microscopia de luz	56
<i>Atta laevigata</i>	57
<i>Camponotus vittatus</i>	58
<i>Pachycondyla villosa</i>	59
7.1.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	61
<i>Atta laevigata</i>	62
<i>Camponotus vittatus</i>	67
<i>Pachycondyla villosa</i>	71
7.2. Bioensaios	80
7.2.1. Corantes vitais – solução de água e mel + Rodamina	81
<i>Atta laevigata</i>	81
<i>Camponotus vittatus</i>	82
<i>Pachycondyla villosa</i>	83
7.2.2. Corantes vitais – óleo de soja + Sudan Black	85
<i>Atta laevigata</i>	85
<i>Camponotus vittatus</i>	86
<i>Pachycondyla villosa</i>	87
7.2.3. Autorradiografia para microscopia de Luz.....	88
7.3. Autorradiografia para microscopia eletrônica de transmissão	89
<i>Atta laevigata</i>	89
8. Discussão.....	101
8.1. Ultramorfologia das glândulas pós-faríngeas (GPF)	101
8.2. Ultraestrutura das glândulas pós-faríngeas (GPF)	105
8.3. Bioensaios	110

8.3.1. Corantes vitais: distribuição da Rodamina B (Reagent)	110
8.3.2. Corantes vitais: distribuição do Sudan Black	114
8.3.3. Autorradiografia	116
9. Considerações finais e conclusões.....	119
10. Referências bibliográficas.....	121

1. Resumo

Uma característica típica das formigas e algumas vespas é a presença das glândulas pós-faríngeas, estrutura que se encontra somente nesses grupos de organismos, fato que deve ter contribuído para o seu sucesso evolutivo. Apesar dos primeiros estudos com as glândulas pós-faríngeas existirem há mais de 100 anos, somente nos últimos 20 elas tem recebido maior atenção dos pesquisadores.

Assim, a presente pesquisa teve por objetivo realizar uma análise comparativa da morfologia das glândulas pós-faríngeas e verificar sua participação na utilização de lipídeos ingeridos por três espécies de formigas com padrões alimentares distintos. Para tal, foi realizada análise ultramorfologica e ultraestrutural das glândulas pós-faríngeas; quantificação da ingestão de lipídeos e carboidratos, e verificação do trajeto destes compostos pelo sistema digestório das operárias; análise autorradiográfica do processo de incorporação do ácido oléico marcado radioativamente pelas glândulas pós-faríngeas das operárias.

Os resultados encontrados sugerem que cada uma das espécies apresenta uma particularidade: as glândulas pós-faríngeas de *Camponotus vittatus* podem ser um sítio de reserva energética para o indivíduo; as operárias de *Atta laevigata* deslocam parte dos lipídeos ingeridos para o intestino médio, evitando o seu acúmulo nas glândulas pós-faríngeas, ao passo que foram encontradas pela primeira vez dois tipos de células nas glândulas pós-faríngeas de *Pachycondyla villosa*. Além disso, o trajeto percorrido pelos alimentos hidrossolúveis no interior do sistema digestório das operárias compreende a cavidade infrabucal, papo e ventrículo. Enquanto que os lipídeos passam pela cavidade infrabucal, glândulas pós-faríngeas e papo, mas não atingem o ventrículo; com exceção de *A. laevigata* em que foram encontrados lipídeos em seu intestino médio. A autorradiografia mostrou que o ácido oléico é absorvido pelo epitélio das glândulas pós-faríngeas, armazenado em seu interior e posteriormente deslocado para a hemolinfa sem sofrer modificações.

2. Abstract

A typical gland found only in ants and some wasps species is the postpharyngeal gland, which could have contributed to the evolutionary success of these social insects. The first studies regarding the morphology and function of the postpharyngeal glands were conducted about 100 years ago, and only in the last 20 years researches gave more attention to its importance.

Thus, this study aimed at comparing the morphology of postpharyngeal glands and to verify their participation in the use of lipids ingested by three ant species. For this purpose, we performed: 1- Ultrastructural and Ultramorphology analysis of the postpharyngeal glands; 2 – the flow of lipids and carbohydrates inside the digestory system; 3 - the incorporation of radiolabeled oleic acid by the postpharyngeal using autoradiographic methods.

Our results suggest that each species has a particularity: the postpharyngeal glands of *Camponotus vittatus* may be act as a site of food reserve, the workers of *Atta laevigata* prevent the accumulation of oleic acid in the postpharyngeal glands by sending lipids ingested to midgut. On the other hand, *Pachycondyla villosa* has specialized cells to eliminate of lipids from the postpharyngeal glands. Moreover, water-soluble diets were found in infrabuccal pockets, crop and ventriculi, while lipid-soluble diets were found in infrabuccal pockets, postpharyngeal glands and crop; except for *A. laevigata*, which also had lipids in their midgut. Autoradiographic analysis showed that oleic acid is absorbed by the epithelium of postpharyngeal glands and later moved to the haemolymph without any modifications.

3. Introdução

Os insetos estavam entre os primeiros organismos que colonizaram o ecossistema terrestre há aproximadamente 400 milhões de anos atrás. No período Permiano, as florestas já eram povoadas por baratas, percevejos e besouros; entre outros insetos. As formigas, da mesma forma que abelhas e vespas sociais, surgiram no período Cretáceo há 100 milhões de anos. Os insetos eussociais, particularmente formigas e cupins, tornaram-se espécies dominantes entre 50 e 60 milhões de anos atrás (HÖLLDOBLER; WILSON 1994).

Na classificação taxonômica as formigas fazem parte de uma única família: Formicidae, da ordem Hymenoptera (BOLTON 1995); sendo que ela está subdividida em 21 subfamílias atuais e quatro subfamílias extintas (BOLTON 2003; http://gap.entclub.org/archive/Bolton_Synopsis_2012_JAN.pdf). Atualmente já foram descritas aproximadamente de 12.760 espécies de formigas (www.antbase.org), sendo que a grande diversidade e abundância deste grupo se devem, em parte, aos seus inúmeros hábitos alimentares. Além disso, estes organismos podem ser encontrados em todos os ecossistemas terrestres com exceção das regiões polares e de algumas das ilhas mais remotas dos oceanos Atlântico e Índico (WILSON; TAYLOR 1967).

O impacto desses organismos nos ecossistemas terrestres é relevante, e eles estão entre os maiores predadores de outros insetos e pequenos invertebrados (WILSON 1971). As espécies dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são consideradas pragas agrícolas devido a seus hábitos herbívoros (CHERRETT 1982), enquanto que outras espécies revolvem grandes

quantidades de solo, misturando restos de plantas e animais tornando-o mais fértil (ABE 1982).

O sistema digestório das formigas adultas é semelhante ao observado na maioria dos insetos e está dividido em três regiões distintas: intestino anterior (estomodeo), intestino médio (mesênteron), e intestino posterior (proctodeo) (CHAPMAN 1998; CAETANO et al. 2002), sendo que cada um deles apresenta diferentes estruturas com funções complementares. As larvas, por sua vez, apresentam algumas estruturas do sistema digestório em fase de diferenciação. A parte funcional é composta por um esôfago curto, pelo proventrículo e por um estômago longo e fechado na região pilórica. A comunicação com o íleo se completa somente no início da pupação (GAMA 1976).

Os insetos apresentam as seguintes glândulas associadas ao sistema digestório: mandibulares, hipofaríngea, salivar da cabeça e salivar do tórax (GAMA 1985). Além destas, as formigas possuem as glândulas pós-faríngeas, que estão ligadas dorsalmente à região final da faringe e são estruturas compartilhadas somente com algumas espécies de vespas (JANET 1905; GAMA 1985; CAETANO 1998; BUENO 2005; STROHM et al. 2010). Um dos pontos-chave em relação às glândulas pós-faríngeas são as várias hipóteses já formuladas na tentativa de explicar suas funções e a origem de seu conteúdo.

De maneira geral, o sistema digestório e suas glândulas anexas estão diretamente relacionados ao processo de digestão e absorção dos alimentos ingeridos pelo organismo. O ácido oléico, substância comumente utilizada na nutrição animal, e um dos principais constituintes das glândulas pós-faríngeas da formiga *S. invicta* (PHILLIPS 1979). É uma das técnicas que tem sido

empregada com sucesso nos estudos que pretendem localizar, quantificar e analisar o metabolismo de compostos no interior do corpo de animais e vegetais é a autorradiografia (NOGUEIRA 1978; LAGE 1980; BUENO 2005).

A autorradiografia consiste em um processo em que uma molécula-alvo é marcada com um átomo radioativo e, dessa forma, sua localização é registrada por meio da precipitação de grãos de prata presentes numa emulsão fotográfica colocada sobre um corte ultrafino de tecido animal ou vegetal, que é observado sob microscópio de luz ou eletrônico de transmissão. Assim, é possível quantificar a molécula por meio da contagem dos grãos de prata precipitados.

O marcador mais utilizado para estudos de autorradiografia é o trítio, um isótopo radioativo do tipo beta negativo derivado do hidrogênio. Ele é bastante utilizado por apresentar meia-vida longa (12 anos), por ser capaz de sensibilizar a emulsão fotográfica num período relativamente curto de tempo e por apresentar baixa energia de emissão, ou seja, apresenta pouco perigo em caso de acidente (BLUMEN; MERZEL 1976).

Apesar dos primeiros estudos com as glândulas pós-faríngeas existirem há mais de 100 anos, somente nos últimos 20 elas tem recebido maior atenção dos pesquisadores. Mesmo assim, na maioria dos gêneros de formiga elas são pouco conhecidas, com descrições morfológicas conflitantes e funções propostas antagônicas.

4. Justificativa e objetivos

Os primeiros estudos com as glândulas pós-faríngeas foram realizados a mais de 100 anos, e somente nos últimos 20 é que essas glândulas receberam maior atenção dos pesquisadores. Apesar disso, estes estudos apresentam descrições morfológicas conflitantes e funções antagônicas para as glândulas pós-faríngeas de uma mesma espécie. Considerando que somente as formigas e algumas vespas possuem as glândulas pós-faríngeas, fato que deve ter contribuído para o sucesso evolutivo desses grupos, a presente pesquisa teve por objetivo realizar uma análise comparativa da morfologia das glândulas pós-faríngeas e verificar sua participação na utilização de lipídeos ingeridos por três espécies de formigas com padrões alimentares distintos: *Atta laevigata*, *Camponotus vittatus* e *Pachycondyla villosa*. Para tal foram realizados:

- 1 - Análise da ultramorfologia e a ultraestrutura das glândulas pós-faríngeas;
- 2 - Quantificação da ingestão de lipídeos e carboidratos, bem como a verificação do trajeto destes compostos pelo sistema digestório das operárias;
- 3 - Análise do processo de incorporação do ácido oléico marcado radioativamente pelas glândulas pós-faríngeas das operárias. Foi analisado se esse composto foi absorvido diretamente pelas glândulas pós-faríngeas das operárias ou se ele foi metabolizado em seu lúmen.

5. Revisão da literatura

5.1. Evolução da alimentação nos himenópteros

O comportamento social das formigas é considerado a estratégia de maior sucesso na história evolutiva dos himenópteros, fato que foi determinante para a diversificação e sucesso desses insetos (HÖLLDOBLER; WILSON 1994). Por outro lado, apesar de não existirem dúvidas a respeito do parentesco das formigas com outros himenópteros aculeados, especificamente com as vespas, pouco se conhece sobre a evolução e diversificação dos Formicidae após a sua derivação da linhagem de vespas ancestrais (WILSON et al. 1967; SAUX et al. 2004).

A ordem Hymenoptera está subdividida em duas subordens: Symphyta e Apocrita, sendo que a evolução dos hábitos alimentares nessas subordens se deu de diferentes formas. Por exemplo, as larvas das espécies da subordem Symphyta são estritamente herbívoras, caráter considerado basal dentro da ordem. Já as larvas da maioria das espécies da subordem Apocrita são zoófagas, sendo que as espécies ancestrais são parasitóides, e não está claro como este caráter evoluiu a partir de ancestrais fitófagos. Atualmente, existem espécies parasitóides em pelo menos metade das famílias de himenópteros, as quais apresentam modificações no aparelho ovipositor (GOULET; HUBER 1993).

As modificações ocorridas no ovipositor desses himenópteros originaram espécies com um aparelho de ferrão bem desenvolvido associado a glândulas de veneno, fato que permitiu que estas espécies se tornassem predadoras ativas. Posteriormente, algumas destas espécies predadoras retornaram à condição fitófaga. Particularmente entre os Aculeados Sociais, as abelhas

passaram a utilizar em sua alimentação néctar, pólen e óleos vegetais, as vespas a consumir pólen e néctar, e as formigas, além de utilizar esses alimentos, também utilizam sementes, corpos de alimentação de vegetais e fungos (DALY 1998). Segundo Tobin (1994), o retorno à fitofagia não envolve utilizar a planta diretamente na alimentação, ou seja, simplesmente ingerir parte ou todo o vegetal, mas sim a capacidade de explorar de várias maneiras os produtos já elaborados por elas.

5.2. Padrão alimentar

A nutrição pode ser definida simplesmente como uma seqüência de reações fisiológicas que leva o indivíduo a procurar e consumir um determinado tipo de alimento, porém, ela envolve várias atividades químicas e processos fisiológicos que transformam o alimento em tecido animal e energia (HOUSE 1974). A maioria das espécies de formiga utiliza em sua dieta alimentar uma variedade de itens de origem animal e vegetal, entretanto, como a maioria dos animais, elas possuem exigências nutricionais específicas. De acordo com Fowler et al. (1991) e Parra (1991), a dieta das formigas é constituída por proteínas, carboidratos e lipídeos.

Assim, o padrão básico encontrado nestes insetos como fonte de proteínas é a predação ou a alimentação baseada em cadáveres de outros animais. Os carboidratos podem ser adquiridos por meio da ingestão de açúcares e polissacarídeos provindos do néctar de plantas ou de outros insetos, e os lipídeos pela ingestão de diferentes tipos de óleos e gorduras. Contudo, esse padrão diversificou-se ao longo da evolução do grupo. Hoje existem desde espécies predadoras ativas até coletoras de sementes, incluindo

as generalistas extremas como as formigas de correição, e até as especialistas em coletar cupins e outras formigas (FOWLER et al. 1991). Uma especialização que deve ser considerada importante nas formigas é o cultivo do seu próprio alimento, como, por exemplo, as espécies da Tribo Attini, que cultivam e alimentam-se de fungos; considerado um fato raro entre os animais (WEBER 1972; HÖLLDOBLER; WILSON 1990).

Espécies de formigas recorrentes em áreas urbanizadas, como *Tapinoma melanocephalum* (Fabricius) e *Monomorium pharaonis* (Linnaeus) apresentam um padrão alimentar diversificado, contudo, experimentos realizados em laboratório revelaram que as operárias dessas espécies preferem alimentos líquidos e adocicados (JESUS 2000). Especificamente, *Camponotus rufipes* (Fabricius) é uma espécie que se alimenta de líquidos provenientes de nectários extra-florais e apresenta um papo bem desenvolvido, que é utilizado para o armazenamento temporário desse tipo de alimento (EISNER 1957). De forma semelhante, 57% da dieta de *Pachycondyla villosa* (Fabricius) é composta por alimentos líquidos (VALENZUELA-GONZALES et al. 1994), enquanto *Atta laevigata* (F. Smith) alimenta-se principalmente de um fungo simbiote e raramente é encontrada em nectários extra-florais (LITTLEDYKE; CHERRETT 1976).

5.3. Ingestão do alimento

A ingestão de alimentos líquidos pode ser feita de duas formas diferentes: lambendo ou sugando o alimento. As formigas são capazes de realizar ambas as formas, entretanto, diferentes espécies preferem uma em relação à outra. De acordo com Paul e Roces (2003), operárias forrageiras de

C. rufipes sugam o alimento líquido e o armazenam no papo, enquanto operárias de *P. villosa* lambem e transportam uma gota de alimento para a colônia entre as mandíbulas, já que não possuem o papo e nem o proventrículo bem desenvolvidos (EISNER 1957). Por outro lado, operárias do gênero *Atta* sugam os líquidos e o armazenam no papo (PAUL; ROCES 2003), mesmo ele sendo menos desenvolvido que o encontrado em *C. rufipes* (CAETANO 1990). Além disso, alguns estudos sugerem que, devido à ausência de trofalaxia entre as operárias adultas do gênero *Atta*, o alimento armazenado no papo não é compartilhado com os demais membros da colônia (ANDRADE 1997; SCHENEIDER et al. 2000; ANDRADE et al. 2002; BUENO 2005).

5.4. Distribuição e utilização dos alimentos entre os indivíduos da colônia

De uma maneira geral, a procura de alimento é realizada por apenas uma pequena parcela das operárias, conseqüentemente, a distribuição dos recursos entre os indivíduos é de extrema importância para a sobrevivência da colônia (EISNER; BROWN 1958). Nesse sentido, numa colônia de formigas a resposta frente a uma fonte de alimento pode ser dividida em dois comportamentos básicos: primeiro, recrutamento das operárias que irão transportar ou ingerir o alimento que se encontra fora do ninho e, segundo, troca e distribuição dos recursos alimentares para os indivíduos no interior do ninho (SORENSEN et al. 1981).

Uma importante característica observada nos insetos holometábolos é a exploração de fontes alimentares distintas pelos indivíduos jovens e adultos. Enquanto as larvas necessitam de elementos nutricionais estruturais (proteínas, sais minerais e vitaminas), os adultos, por apresentarem alta

atividade dentro e fora da colônia, suprem suas necessidades energéticas utilizando principalmente os carboidratos e gorduras (FOWLER et al. 1991). Assim, o sucesso dos Hymenoptera estaria relacionado, dentre outros fatores, ao fato de suas formas jovens estarem adaptadas a nichos ecológicos distintos dos adultos, o que de certa forma as impediria de competir por alimento (TERRA 1991).

Em colônias de *S. invicta* os alimentos ricos em proteína são coletados pelas operárias e distribuídos para a cria mais rapidamente do que misturas ricas em óleos ou méis (VINSON 1968; SORENSEN et al. 1981); e em maior quantidade (WEEKS et al. 2004). De forma semelhante, as operárias de *Linepithema humile* (Mayr) transferem as proteínas para larvas e rainhas, retendo as substâncias açucaradas (MARKIN 1970). Os lipídeos, assim como os carboidratos, são rapidamente repartidos entre as operárias da colônia (ECHOLS 1966), embora eles também sejam oferecidos para as larvas em grande quantidade (VINSON 1968; LOFGREN et al. 1975 apud FOWLER et al. 1991).

Um fator que pode influenciar a distribuição dos alimentos entre os indivíduos de um mesmo ninho é o estado nutricional da colônia. Em experimentos utilizando marcadores radioativos, Howard e Tschinkel (1980) mostraram que em colônias de *Solenopsis invicta* (Buren) que não estavam de jejum apenas 30% dos indivíduos receberam alimento após um período de 24 horas. Entretanto, as operárias que permaneceram em jejum por até duas semanas distribuíram alimento para até 50% da colônia num intervalo de sessenta minutos.

Apesar da variedade de alimentos que pode ser ingerida pelas formigas, o comportamento de alimentação das castas pode ser bastante especializado. Enquanto os imaturos recebem alimentos sólidos e/ou líquidos, os adultos alimentam-se apenas de líquidos, e isso ocorre devido a diferenças em sua morfologia e sistema digestório (EISNER; HAPP 1962; PETRALIA; VINSON 1978).

As larvas de algumas espécies possuem projeções cuticulares que fixam o alimento sólido em sua região ventral (PETRALIA; VINSON 1978). Uma vez que as larvas não possuem papo, o alimento sólido passa diretamente para o ventrículo, onde é digerido. Ao contrário, a ingestão de partículas sólidas pelos adultos durante a alimentação pode bloquear o proventrículo, impedindo sua passagem para o intestino médio (EISNER; HAPP 1962). Eventualmente, partículas menores que 1µm podem ser encontradas no papo de adultos de *S. invicta* (GLANCEY et al. 1981). Por outro lado, em um estudo recente, Paul e Roces (2003) sugeriram que a taxa de ingestão de fluídos não estaria relacionada somente à morfologia do proventrículo e/ou tamanho do papo, mas também seria reflexo das adaptações ecológicas de forrageamento. Operárias de espécies que freqüentemente alimentam-se de líquidos, como *C. rufipes*, apresentam uma maior taxa de ingestão deste tipo de alimento do que operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel) e *Rhytidoponera impressa* (Mayr), as quais não são especializadas na coleta de recursos líquidos.

Independente da preferência, do padrão alimentar ou da maneira com a qual os recursos alimentares são adquiridos e distribuídos, o metabolismo nutricional ocorre no interior do sistema digestório das larvas e adultos.

5.5. Sistema digestório

O sistema digestório das formigas é semelhante ao encontrado em outros insetos e está dividido em três regiões distintas: intestino anterior (estomodeo), intestino médio (mesêntero) e intestino posterior (proctodeo). A Figura 1 contém uma representação das regiões, das glândulas anexas e das principais estruturas associadas ao sistema digestório de formigas.

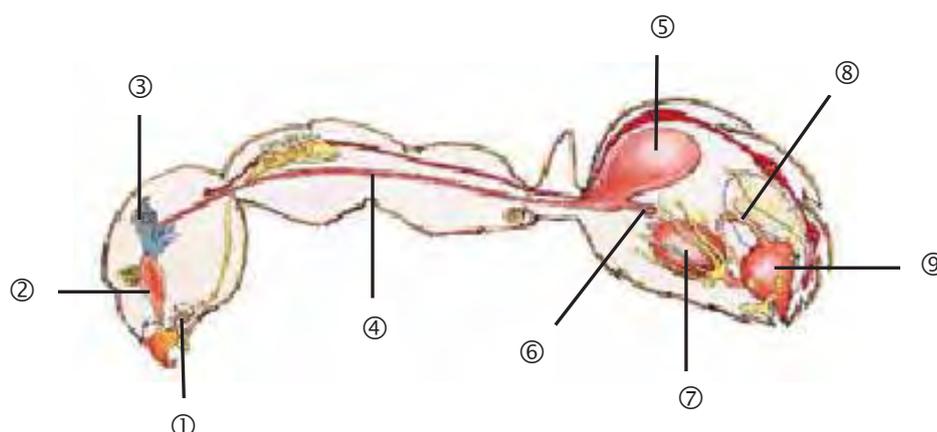


Figura 1. Principais estruturas encontradas no sistema digestório dos adultos de formigas. ① - Cavidade infrabucal; ② - Faringe; ③ - Glândulas pós-faríngeas; ④ - Esôfago; ⑤ - Papo; ⑥ - Proventrículo; ⑦ - Ventrículo; ⑧ - Íleo; ⑨ - Reto (Modificado de HÖLLDOBLER; WILSON 1990).

Por serem de origem ectodérmica o estomodeo e o proctodeo são revestidos por uma cutícula, que é impermeável a partículas de alta massa molecular como polissacarídeos e alguns dissacarídeos; além de ser contínua com aquela que recobre o corpo do indivíduo. A cutícula do proctodeo difere daquela do estomodeo por ter menos de 10 μm de espessura e por ser mais permeável (CHAPMAN 1998).

Na porção inicial do intestino anterior, logo após as peças bucais e precedendo a abertura oral, existe a cavidade infrabucal, que é uma bolsa

formada pelo dobramento do epitélio inferior da faringe, e sua principal função é reter partículas sólidas ingeridas pela formiga durante a alimentação (JANET 1905; GOTWALD 1969). A abertura da boca localiza-se antero-dorsalmente à cavidade infrabucal, seguida de uma faringe musculosa e do esôfago (BUENO 2005). Este é um tubo longo e delgado que percorre todo o mesossoma e o pecíolo do inseto, abrindo-se no papo no interior do gáster, o qual é seguido pelo proventrículo, que corresponde ao limite entre o intestino anterior e médio. Na transição entre os intestinos existe a válvula cardíaca, que impede o retorno de alimento do ventrículo para o papo (CAETANO 1988).

O intestino médio é de origem endodérmica e está diretamente envolvido na produção e secreção de enzimas digestivas, bem como na absorção de nutrientes, além de produzir a membrana peritrófica que envolve o alimento, separando-o do epitélio celular (CHAPMAN 1998). Na maioria das formigas, embora bastante delgada, a matriz peritrófica tem a função de separar o alimento recém-ingrido daquele que já está em processo de digestão. Além disso, o ventrículo é formado por dois tipos de células: as digestivas e as generativas, sendo que as digestivas têm funções variadas e apresentam características de células secretoras, excretoras e de absorção (WALKER; CLOWER 1961; CAETANO 1988).

O intestino posterior corresponde à porção final do canal alimentar freqüentemente apresenta três regiões: piloro, íleo e reto. Os insetos que possuem simbioses no proctodeo apresentam o íleo expandido para abrigar tais organismos (CAETANO 2002). No reto, há papilas retais que reabsorvem água e íons importantes para o equilíbrio fisiológico do organismo, como sódio e potássio (WALL; OSCHMAN 1975). Em relação ao papo, o íleo e o reto

apresentam uma maior permeabilidade aos aminoácidos e monossacarídeos, entretanto, são praticamente impermeáveis aos polissacarídeos (CHAPMAN 1998).

As larvas, por sua vez, apresentam algumas estruturas do sistema digestório em fase de diferenciação. A parte funcional é composta por um esôfago curto, pelo proventrículo e por um estômago longo; que é fechado na região pilórica e a comunicação com íleo só se completa no início da pupação (GAMA 1976).

5.6. Glândulas pós-faríngeas (GPF)

As glândulas pós-faríngeas das formigas têm origem ectodérmica, surgindo durante o desenvolvimento pós-embriônico a partir de duas evaginações dorsais do epitélio faríngeo (JANET 1905; GAMA 1985). Recentemente, essas glândulas foram descritas em algumas espécies de vespas (STROHM et al. 2010), e os autores sugerem que apesar de possuírem funções diferentes, as glândulas pós-faríngeas de vespas e formigas são estruturas que tem origem homóloga a partir de um ancestral comum.

Nas formigas, logo após o ducto de ligação com a faringe, as glândulas pós-faríngeas se bifurcam, podendo apresentar um número variável de digitações de aspecto tubular em sua região apical. Pode-se citar como exemplo as glândulas pós-faríngeas da formiga *A. sexdens rubropilosa*, em que as rainhas possuem de 80 a 100 digitações, os soldados de 30 a 40 digitações, nas operárias médias o número de digitações é em torno de 20 a 25 e nas operárias mínimas cerca de 10 a 15 (BUENO 2005). Diferente de *A. sexdens rubropilosa*, as glândulas pós-faríngeas encontradas nas formigas *Dinoponera*

australis (Roger) e *Paratrechina fulva* (Mayr) não possuem digitações, mas sim, dois lóbulos achatados dorso-ventralmente, um de cada lado da glândula (CAETANO 1998; JESUS 2006).

De acordo com Hölldobler e Wilson (1990), nas subfamílias Myrmicinae, Formicinae e Dolichoderinae essas glândulas fornecem nutrientes para os indivíduos da colônia. Existem evidências disso nos estudos de Markin (1970) e Delage-Darchen (1976), nos quais foi verificado que das glândulas pós-faríngeas de *L. humile* e *Messor* (Forel), respectivamente, provêm importantes nutrientes para as rainhas e pequenas larvas da colônia.

De outra maneira, Vinson et al. (1980) sugeriram que as glândulas pós-faríngeas de *S. invicta* atuam como cecos cefálicos, absorvendo ácidos graxos e triglicerídeos, fato contestado por Vander-Meer et al. (1982). Além disso, Bagnères e Morgan (1991) verificaram que, na mesma espécie, os hidrocarbonetos das glândulas pós-faríngeas são semelhantes àqueles encontrados na cutícula das operárias, que teriam função de reconhecimento específico e intracolônial. Em vista disso, sugeriram que o papel nutritivo dessas glândulas deveria ser reavaliado, fato que foi reforçado com os experimentos realizados por Soroker et al. (1994) utilizando espécies de formigas que apresentam altos índices de trofalaxia.

Outros autores sugeriram que o conteúdo das glândulas pós-faríngeas é utilizado no processo de alimentação dos indivíduos da colônia. Ayre (1967) observou que o ventrículo das larvas de *Camponotus pennsylvanicus* (DeGeer) continha alimento regurgitado do papo e traços das substâncias oleosas encontradas nas glândulas pós-faríngeas das operárias. Contudo, infelizmente esse autor não descreve como foram realizados os experimentos que o

levaram a tais conclusões. Por outro lado, Markin (1970) mostrou por meio de isótopos radioativos que o conteúdo das glândulas pós-faríngeas das operárias de *L. humile* é utilizado na alimentação de larvas e rainhas. Assim, as glândulas pós-faríngeas estariam associadas ao processo de trofalaxia, e não à digestão dos compostos lipídicos nas operárias (Ayre 1963). De acordo com Wheeler (1994), é possível que o alimento glandular seja de extrema importância na dieta de algumas espécies de formiga. Contudo, a natureza, função e diversidade das secreções das glândulas que liberam o seu conteúdo na porção anterior do canal alimentar ainda são pouco conhecidas.

Além da função secretora, a morfologia do epitélio celular dessas glândulas também é discutível, uma vez que existem discordâncias entre diferentes autores em relação a uma mesma espécie de formiga (SCHOETERS; BILLEN 1996; CAETANO 1998).

Ampliando as discussões, Kaib et al. (2000) verificaram que a composição dos hidrocarbonetos cuticulares e das glândulas pós-faríngeas presentes nas operárias forrageiras de *Myrmicaria eumenoides* (Gerstaecker) diferiam daqueles encontrados nas operárias que permaneciam dentro da colônia, indicando que estes compostos estariam relacionados diretamente com a função que o indivíduo desempenha na colônia. As informações disponíveis a respeito da origem do conteúdo das glândulas pós-faríngeas são igualmente diversificadas e, de acordo com alguns pesquisadores, seu conteúdo seria produzido pelo próprio epitélio ou proveniente do alimento ingerido (PHILLIPS; VINSON 1980a; WHEELER 1994; BUENO 2005; JESUS 2006). Assim, de acordo com estes trabalhos o conteúdo dessas glândulas não seria proveniente da hemolinfa do inseto. Nas espécies *L. humile*, *Acromyrmex*

octospinosus (Reich) e *S. invicta* o lúmen dessas glândulas é preenchido por uma substância oleosa de coloração amarelada, sendo que sua origem estaria ligada diretamente à ingestão de lipídeos provenientes da alimentação (MARKIN 1970; PEREGRINE; MUDD 1974; PHILLIPS; VINSON 1980b). Já Paulsen (1969) acredita que os lipídeos encontrados nas glândulas pós-faríngeas de operárias de *Formica polyctena* (Förster) são sequestrados da hemolinfa e posteriormente distribuídos para toda a colônia.

Apesar das contradições apresentadas, as glândulas pós-faríngeas sempre contem lipídeos em seu interior. Para as espécies *A. sexdens rubropilosa* (BUENO 2005), *T. melanocephalum*, *L. humile*, *P. fulva* e *M. pharaonis* (Jesus 2006) foi verificado que no caso da quantidade de alimento ingerido ser pequena, os alimentos lipossolúveis e hidrossolúveis são separados no final da faringe, e percorrem caminhos distintos. Os lipídeos se deslocam para as glândulas pós-faríngeas, onde são absorvidos (BUENO 2005), enquanto os alimentos hidrossolúveis vão para o papo e depois para o ventrículo (JESUS 2006). Entretanto, se a oferta de alimento for alta o excesso de óleo ingerido passa pela faringe e esôfago, atingindo o papo. Uma vez no papo, os lipídeos não passam para o ventrículo e, após algum tempo, retornam para as glândulas pós-faríngeas (PHILLIPS; VINSON 1980b; JESUS 2006).

Fato semelhante pode ser observado nos trabalhos realizados por Phillips e Vinson (1980a) e Wheeler (1994), nos quais os lipídeos ingeridos pelas operárias de *S. invicta* vão diretamente para o lúmen das glândulas pós-faríngeas, ao passo que substâncias açucaradas são armazenadas no papo.

5.7. Utilização do ácido oléico

Diversos trabalhos já relataram a presença de lipídeos no interior das glândulas pós-faríngeas das formigas (JANET 1905; PEREGRINE; MUDD 1974; PHILLIPS; VINSON 1980b; BUENO 2005; JESUS 2006), sendo que um dos principais lipídeos encontrados nas glândulas pós-faríngeas de *S. invicta* é o ácido oléico (PHILLIPS 1979).

O processo de filtração do alimento e a utilização do ácido oléico por operárias e rainhas da formiga cortadeira *A. sexdens rubropilosa* foi detalhado por Bueno (2005). Utilizando a técnica de autorradiografia este pesquisador verificou a importância das glândulas pós-faríngeas na incorporação e absorção dos lipídeos ingeridos.

5.8. Autorradiografia

5.8.1. Histórico

Os métodos autorradiográficos remontam aos primórdios da descoberta da radioatividade (Blumen; Merzel 1976). Em 1867, Niepse de St. Victor foi o primeiro pesquisador a realizar um experimento que resultou no enegrecimento de uma emulsão fotográfica quando em contato com nitrato e tartarato de urânio. Nesta época a radioatividade ainda não havia sido descoberta e os resultados de seus experimentos foram interpretados como luminescência.

Posteriormente, Henri Becquerel (1896) repetiu e estendeu os experimentos de Niepse, obtendo imagens fotográficas acidentalmente (autorradiografias), detectando pela primeira vez a radioatividade. Fato este, que sucedeu a descoberta dos Raios-X por Wilhelm Conrad Roentgen (1895). Em seguida, Madame Curie, trabalhando com diferentes compostos de urânio,

conseguiu demonstrar que as emissões eram diretamente proporcionais à quantidade de material neles presente. Em 1898, esta pesquisadora fez três descobertas: demonstrou a radioatividade do Tório, na mesma época em que G. C. Schmidt o fez; isolou em meio a amostras de minério de urânio quantidades diminutas de um novo elemento, ao qual deu o nome de Polônio; e identificou outro elemento, em quantidades menores ainda: o rádio. A ela deve-se a terminologia da palavra “Radioatividade”.

Em 1924 os primeiros pesquisadores a obterem auto-radiografias em seres vivos foram Lacassagne & Lattes, injetando pó radioativo (elemento natural) em animais. Contudo, somente em 1946 com Belanger & Leblond (técnica de “Dipping”) e Pelc em 1947 (técnica do “Stripping-Film”), é que as técnicas atuais de autorradiografia foram estabelecidas permitindo o rápido desenvolvimento do método e suas aplicações.

Nas últimas décadas, ocorreram profundas transformações no entendimento de biologia celular graças ao desenvolvimento do microscópio eletrônico, sendo que os primeiros estudos associando as técnicas autorradiográficas ao microscópio eletrônico foram realizados por Liquier-Mildward (1956).

De maneira geral, pode-se dizer que os avanços biológicos na atualidade, utilizando autorradiografia, se devem a vários fatores, entre eles: produção em escala industrial de emulsões fotográficas sensíveis aos elétrons de baixa ionização; síntese de inúmeras moléculas marcadas que atuam como precursores específicos; possibilidade de obtenção de dados quantitativos, além das informações a respeito da localização do radioisótopo; e utilização

das técnicas autorradiográficas associadas ao microscópio eletrônico (Blumen; Merzel 1976).

5.8.2. A Técnica de autorradiografia

A autorradiografia biológica é uma técnica que permite localizar e visualizar um composto que tenha sido incorporado por um ser vivo e relacioná-lo com as estruturas nas quais ele foi armazenado e/ou metabolizado (BLUMEN; MERZEL 1976; BIENZ 1977). Esta técnica tira proveito do fato de plantas e animais não diferenciarem compostos estáveis ou isótopos radioativos, de um mesmo elemento químico, durante seus processos fisiológicos.

Para que seja possível localizar a radioatividade emitida pelo marcador no interior do material de estudo, utilizam-se métodos fotográficos, ou seja, cortes ultrafinos de tecido animal ou vegetal contendo o marcador são primeiramente colocados em contato com uma emulsão fotográfica. Posteriormente este material é levado para um local com ausência total de luz até que a radiação emitida pelo marcador produza uma imagem latente na emulsão fotográfica. Esta imagem torna-se visível com a aplicação de técnicas de revelação fotográfica sobre o material. Os cortes ultrafinos são então levados ao microscópio de luz ou eletrônico de transmissão para análise.

5.8.3. Formação da imagem

Uma emulsão fotográfica é basicamente um conjunto de cristais de brometo de prata dispersos numa matriz gelatinosa. No momento em que esta emulsão é exposta à radiação ou à luz, os cristais reagem formando diversos agrupamentos de átomos de prata. Estes agrupamentos são denominados “centros de imagem latente”, pelo fato dessa imagem não ser visível até que a emulsão seja revelada e os centros de imagem transformados em prata metálica. O tamanho dos cristais de prata é o fator que determina a sensibilidade da emulsão, pois quanto maior o cristal, mais sensível à radiação será a emulsão (Polysciences. INC.).

5.8.4. Aplicações

A autorradiografia biológica vem sendo utilizada de diferentes formas, dentre elas pode-se destacar: **1- Técnica histoquímica:** utilizada para identificação química de estruturas celulares ou tissulares. Por exemplo, a incorporação de ^{35}S administrado sob a forma de sulfato de sódio tem sido usada para evidenciar a produção de mucopolissacarídeos sulfatados (Dziewiatkowsky 1949); **2- Traçadores de reações metabólicas:** permite determinar os locais de síntese e migração de produtos celulares. Como exemplo, a utilização de uridina-5- ^3H para identificação do sítio intracelular de síntese e replicação de RNA de vírus fitopatogênicos (Nogueira 1978).

Entretanto, o aspecto mais interessante da autorradiografia é seu uso no estudo dinâmico dos componentes de um ser vivo. Esta técnica permitiu a introdução da dimensão “tempo” na morfologia das células e tecidos (Leblond 1965), uma vez que em tempos sucessivos após a administração de um

composto radioativo é possível, a partir de imagens estáticas, estudar a cinética das estruturas marcadas. Como exemplo pode-se citar o estudo da incorporação de ácido oléico- ^3H pelas glândulas pós-faríngeas da formiga *A. s. rubropilosa* (Bueno 2005).

5.8.5. Características do marcador

Para que sejam obtidos bons resultados em estudos autorradiográficos, as principais características que devem ser observadas em um marcador são: **1- Meia-vida física:** deve ser suficientemente longa para permitir a realização do trabalho com desprezível queda de sua radioatividade; **2- Atividade específica:** deve ser suficiente para sensibilizar os cristais de brometo de prata da emulsão fotográfica; **3- Energia de emissão:** deve ser baixa, pois a energia de radiação está diretamente relacionada com a resolução das autorradiografias. Neste caso, se for utilizado um emissor de partículas beta de alta energia, estas poderão passar através da fina camada de emulsão fotográfica, produzindo sua ionização longe da fonte, ou ainda, impregnando mais de um grão de prata por radiação emitida.

Por esse motivo, o marcador comumente utilizado na técnica de autorradiografia em nível de microscopia eletrônica é o trítio. Trata-se de um isótopo radioativo do hidrogênio emissor de partículas beta com meia vida longa (12,3 anos), atividade específica suficiente para sensibilizar a emulsão fotográfica num período de tempo relativamente curto, e de baixa energia, o que permite maior poder de resolução (LEDERER et al. 1967; BLUMEN ; MERZEL 1976).

Além disso, foi demonstrado por Pelc (1963) que cada radiação emitida pelo trítio praticamente é capaz de afetar apenas um cristal de brometo de prata por vez. Outros radioisótopos que podem ser utilizados em estudos autorradiográficos são: ^{14}C , ^{125}I e ocasionalmente ^{32}P e ^{35}S .

Nos estudos autorradiográficos utilizando microscopia eletrônica a resolução é definida em termos de probabilidade de ser formado um grão de prata numa determinada região próxima da fonte de radiação. Bachmann et al. (1969) definiram esta resolução como sendo a distância da fonte, dentro da qual se localizam 50% do total de grãos de prata por ela produzidos.

6. Material e métodos

6.1. As espécies de formigas

Foram utilizadas três espécies de formigas com padrões alimentares distintos e que apresentam reconhecida importância econômica. São elas: subfamília Myrmicinae - *Atta laevigata* F. SMITH 1858; subfamília Formicinae – *Camponotus vittatus* FOREL 1904; subfamília Ponerinae - *Pachycondyla villosa* FABRICIUS 1804.

As operárias utilizadas eram forrageiras de ninhos de campo situados na cidade de Rio Claro-SP, nas dependências do Campus João Dias da Silveira da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Elas foram coletadas e transferidas para o laboratório e permaneceram 24h sem alimentação antes de cada bioensaio.

Para as espécies que apresentam operárias polimórficas os indivíduos foram selecionados de acordo com tamanho de sua cápsula cefálica. Nesse sentido, para as espécies *C. vittatus* e *A. laevigata* foram utilizadas operárias de tamanho médio. Por outro lado, para a espécie *P. villosa* em que as operárias são monomórficas os indivíduos foram coletados indistintamente.

6.2. Bioensaios

Para todos os bioensaios que serão descritos a seguir foi estabelecido um grupo controle composto por 10 operárias. Essas operárias não receberam nenhum tipo de alimento e tiveram as glândulas pós-faríngeas removidas para análise, servindo como padrão para as comparações dos grupos experimentais. Para tal, cada glândula foi dissecada, preparada e fotografada com auxílio de um estereomicroscópio (Leica MZ-APO) e de microscópios eletrônicos de transmissão e de varredura.

6.2.1. Aplicação das dietas

Tanto para os experimentos que utilizaram os corantes vitais, quanto para os alimentos contendo marcadores radioativos, a aplicação das dietas foi realizada da seguinte forma:

Para as espécies *A. laevigata* e *C. vittatus* foram utilizadas 70 operárias em cada bioensaio, enquanto para a espécie *P. villosa* foram utilizadas 18 operárias, já que as colônias dessa espécie são de tamanho reduzido. Deve-se ressaltar que elas foram alimentadas com apenas um tipo de dieta por vez. Essa diferença se deve

As operárias foram coletadas no campo e permaneceram 24 horas sem nenhum tipo de alimentação. Em seguida, elas foram pré-anestesiadas por resfriamento (-4°C) durante aproximadamente 30 segundos, e então receberam 0,5µL de alimento entre as mandíbulas com auxílio de uma micropipeta monocal LM2 LabMate[®]. Posteriormente, elas foram divididas em grupos de 10 e distribuídas em placas de Petri (10 cm de diâmetro) forradas com papel de filtro; com exceção da espécie *P. villosa* que foi dividida em grupos de três

operárias. As placas de Petri foram mantidas no interior de estufa B.O.D com temperatura controlada entre 24-26°C e umidade relativa acima de 70%. Durante o isolamento as operárias não receberam alimento.

Os intervalos de tempo em que os indivíduos permaneceram na estufa variaram de acordo com a espécie. Para *A. laevigata* e *C. vittatus* os intervalos de tempo foram iguais a 10 min, 1h, 2h, 8h, 12h, 24h, e 72 horas. Ao passo que para a espécie *P. villosa* os tempos foram iguais a 10 min; 45 min, 2h, 12h, 24h e 72 horas.

6.3. Dissecção das glândulas pós-faríngeas

Para a retirada das glândulas pós-faríngeas as operárias foram anestesiadas por resfriamento (-4°C) durante cinco minutos com o propósito de interromper os seus processos metabólicos. Em seguida elas foram transferidas para uma placa de Petri (8 cm diâmetro) preenchida com solução salina (6g de NaCl por 1000 mL de água destilada), e então, com o auxílio de pinças e lâminas de barbear foram dissecadas sob um estereomicroscópio (Leica MZ-APO).

6.4. Preparo para microscopia

Para todos os experimentos e análises realizados neste trabalho as glândulas pós-faríngeas foram fixadas por 24 horas da seguinte maneira:

* *A. laevigata*: As glândulas foram fixadas utilizando-se solução Karnovsky modificado composto por Tampão Cacodilato de Sódio a 0,0875 M, Glutaraldeído a 1,875% e Formaldeído a 1,5%.

* *C. vittatus*: As glândulas foram fixadas utilizando-se solução Karnovsky modificado composto por Tampão Cacodilato de Sódio a 0,1 M, Glutaraldeído a 1,675% e Formaldeído a 1,7%.

* *P. villosa*: As glândulas foram fixadas utilizando-se solução Karnovsky modificado composto por Tampão Cacodilato de Sódio a 0,125 M, Glutaraldeído a 2,5% e Formaldeído a 2,0%.

A concentração dos fixadores foi ajustada para se obter a melhor preservação possível das estruturas analisadas em cada uma das espécies.

6.4.1. Microscopia de luz – Controle

Depois de retiradas e fixadas, dez glândulas pós-faríngeas de cada uma das espécies foram desidratadas, em banhos de 15 minutos cada, em uma série crescente de álcool (70%, 75%, 80% e 95%) e transferidas para resina de embebição por 24 horas. A inclusão foi feita em resina Leica[®] utilizando-se moldes de plástico. Os moldes permaneceram em estufa a uma temperatura de 37°C durante 48 horas. Após esse período, os blocos contendo o material foram seccionados (4 µm de espessura) com auxílio de um micrótomo Leica RM 2145.

O material foi então colocado sobre lâminas histológicas e corado com azul de metileno da seguinte maneira: gotas do corante foram colocadas sobre a lâmina, que foi aquecida por um minuto a 30°C, seguida de lavagem em água corrente e posterior secagem à temperatura de 37°C.

As lâminas foram então observadas sob um microscópio de luz Zeiss Dx 80 para documentação fotográfica.

6.4.2. Preparo para microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Depois de retiradas e fixadas, dez glândulas pós-faríngeas passaram por duas lavagens de 15 minutos em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M. Realizou-se então a pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M durante duas horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as glândulas pós-faríngeas foram lavadas mais duas vezes em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M durante 15 minutos, e contrastadas em solução de acetato de uranila 2% com acetona 10% durante três horas no escuro.

A desidratação do material foi realizada em concentrações graduais de acetona (50%, 75%, 90%, 95% e 100%) durante cinco minutos cada. Com exceção da acetona 100% que foi utilizada para desidratar as glândulas duas vezes durante dez minutos cada. Em seguida, a infiltração do material foi feita em uma mistura de acetona e resina (1:1) durante 12 horas. Posteriormente, as glândulas foram colocadas em moldes de borracha apropriados contendo resina pura e um catalisador, e colocadas em estufa a 60°C durante 48 horas. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados numa espessura variando de 60 nm a 90 nm com auxílio de um micrótomo Leica RM 2145. As

secções foram dispostas em telinhas de cobre e foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo durante 45 e 10 minutos, respectivamente. As telinhas foram então observadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Phillips[®] 100 TEM, realizando-se a documentação fotográfica.

6.4.3. Preparo para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após retiradas e fixadas, as glândulas pós-faríngeas de cada uma das espécies receberam os seguintes tratamentos:

- 1- Desidratação em concentrações graduais de acetona (50%, 75%, 90%, 95% e 100%) durante cinco minutos cada. Com exceção da acetona 100% que foi utilizada para desidratar as glândulas duas vezes durante dez minutos cada.
- 2- Processamento em aparelho de ponto crítico (BALZERS CPD-030). Fixação das glândulas sobre “stubs” com auxílio de fita dupla-face, e em seguida, cobertura de fina camada de ouro (SPUTTERING SCD-050).
- 3- Observação, análise e obtenção de fotomicrografias com auxílio de um microscópio eletrônico de varredura Philips[®] SEM 505.

6.5. Corantes vitais

Para os bioensaios utilizando os corantes vitais foram formuladas duas dietas: 1 - O corante Sudan Black foi dissolvido em óleo de soja numa concentração final de 0,1%; 2 - A Rodamina foi dissolvida numa solução de água e mel (1:1) numa concentração final de 0,15%. O Sudan Black foi utilizado como marcador da dieta oleosa já que ele apresenta alta solubilidade

em lipídeos, ao passo que a Rodamina foi utilizada como marcador da dieta açucarada por apresentar alta solubilidade em água.

Ao final de cada um dos períodos descritos no item 6.2.1, dez operárias foram dissecadas para avaliação da intensidade de coloração e localização dos marcadores. As estruturas analisadas foram a cavidade infrabucal, as glândulas pós-faríngeas, o papo, o ventrículo e o reto.

A quantidade de alimento encontrado nessas estruturas foi avaliada por meio de análise visual utilizando a seguinte escala: 0 = ausência de alimento, 1 = pequena quantidade de alimento, 2 = média quantidade de alimento e 3 = grande quantidade de alimento.

6.6. Autorradiografia

Os experimentos descritos a seguir foram realizados nas dependências do Laboratório de Histopatologia Vegetal – USP – CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura), com a supervisão da Prof^a Dr^a Neusa de Lima Nogueira.

6.6.1. Marcadores radioativos

No presente trabalho foi utilizado um composto lipídico marcado com trítio, que é um dos isótopos radioativos do hidrogênio:

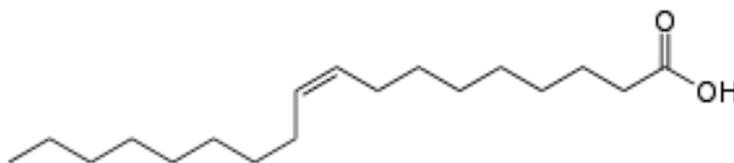
1 - **Ácido Oléico Tritiado [9, 10 – ³H(N)]** em solução de tolueno na concentração radioativa de 5,0 mCi/mL (Amersham Biosciences[®]). O ácido oléico é um ácido graxo insaturado de cadeia longa, além de ser o mais comum e abundante lipídeo encontrado na natureza (STEADMAN 1995). Algumas de suas características químicas são:

Fórmula molecular: $C_{18}H_{34}O_2$ – [CH₃(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇COOH]

Solubilidade em água: Insolúvel em água

Massa Molar: 282,5 g/mol

Fórmula estrutural:



Para os bioensaios utilizando o marcador radioativo a dieta foi formulada misturando-se o ácido oléico tritiado com óleo de soja numa proporção de 1:4.

Ao final de cada um dos períodos descritos no item 5.2.1 as operárias foram dissecadas para se avaliar a distribuição, localização e absorção do ácido oléico nas glândulas pós-faríngeas. Para tal, o material foi analisado utilizando-se técnicas autorradiográficas de microscopia de luz eletrônica de transmissão. Deve ser ressaltado que este bioensaio foi realizado somente com operárias de *A. laevigata*.

6.7. Preparação da autorradiografia para microscopia

Todos os procedimentos de diluição da emulsão fotográfica e cobertura dos cortes foram realizados numa câmara escura com ausência total de luz branca. Neste caso utilizou-se uma fonte de luz monocromática vermelha a qual não causa danos à emulsão fotográfica. Além disso, todo material utilizado para manipular a emulsão fotográfica foi previamente fervido em solução de água oxigenada (H₂O₂) 15% durante 20 minutos, lavados com água bidestilada e secados em estufa para evitar o “background”.

6.7.1. Autorradiografia para microscopia de luz

A técnica de autorradiografia para microscopia de luz foi utilizada exclusivamente para estimar o período de exposição do material necessário para a autorradiografia de microscopia eletrônica, ou seja, o número de dias necessário para se obter um número de grãos de prata adequado foi multiplicado por 10, o que corresponde ao período de exposição ideal para se realizar os procedimentos de microscopia eletrônica de transmissão (Nogueira 1978).

Inicialmente, as glândulas pós-faríngeas retiradas das operárias que receberam a solução radioativa foram incluídas em blocos de resina (item 6.4.2). Foram feitas secções semi-finas (4 μm de espessura) da região superior das glândulas utilizando-se um micrótomo Leica RM 2145. Os cortes foram transferidos para lâminas histológicas previamente limpas com detergente e solução de éter e álcool (1:1). A posição dos cortes foi marcada no verso da lâmina com caneta para retroprojeter (Pilot[®]), e então as lâminas foram secas em chapa quente para evitar o enrugamento dos cortes (Bienz 1977).

Os cortes sobre as lâminas foram cobertos com uma fina camada de emulsão fotográfica (Ilford L4 – Polysciences INC.) utilizando-se o método de “streaking” (Bienz 1977). Para tal, a emulsão foi primeiramente fundida em banho-maria a 42°C, então diluída em água bidestilada 1:1, e mantida a 32°C após a diluição. Três gotas desta solução foram colocadas nas lâminas e espalhadas rapidamente sobre os cortes com auxílio de uma pipeta Pasteur (Figura 2). Imediatamente após este procedimento as lâminas foram dispostas verticalmente no interior de caixas pretas, vedadas com fita, e mantidas a 4°C durante três, sete e dez dias.

Após o período de exposição, as lâminas foram reveladas utilizando-se o revelador Dektol da Kodak™ durante quatro minutos e fixadas com o fixador F-5 da Kodak™ durante cinco minutos, ambos a 22°C. Após a fixação, as lâminas foram lavadas em água corrente à temperatura ambiente, repassadas em água destilada e colocadas para secagem a 37°C. Em seguida, o material foi corado com azul de metileno da seguinte maneira: gotas do corante foram colocadas sobre a lâmina, que foi aquecida por um minuto a 30°C, seguida de uma lavagem em água corrente e posterior secagem à temperatura de 37°C).

Posteriormente as lâminas foram observadas com auxílio de um microscópio de luz Zeiss Dx 80.

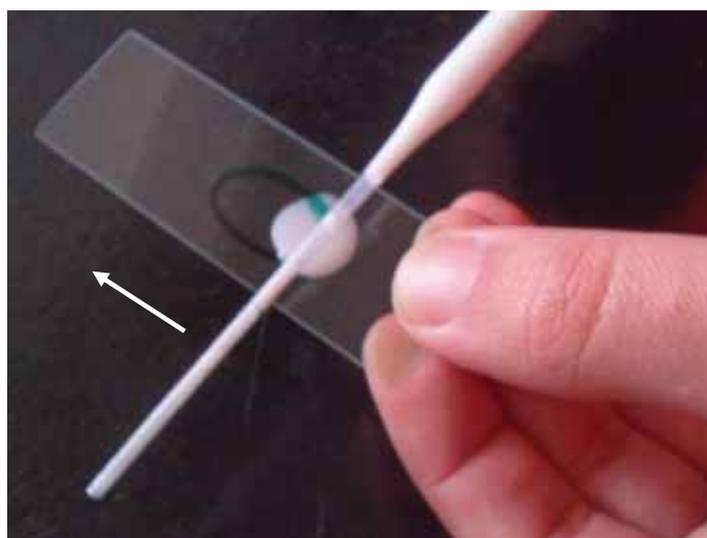


Figura 2. Cobertura dos cortes utilizando a técnica de autorradiografia para microscopia de luz: a emulsão fotográfica é espalhada com o auxílio de uma pipeta Pasteur sobre o material a ser analisado em uma sala com ausência de luz.

6.7.2. Autorradiografia para microscopia eletrônica de transmissão

A metodologia utilizada para cobertura dos cortes ultrafinos foi baseada em Caro & Van Tubergen (1962), posteriormente modificada por Stevens (1966).

Foram feitas secções ultrafinas das glândulas pós-faríngeas com espessura entre 60nm e 90nm, em seguida elas foram colocadas sobre telinhas de cobre de 200 “mesh”, previamente cobertas com película de colódio e carvão. Para cada tempo (item 6.2.1) foram realizadas três repetições.

Bastonetes de vidro foram colocados em suportes de madeira e sobre eles colocado fita dupla-face (Figura 3A). As telinhas contendo os cortes ultrafinos foram fixadas no topo destes bastonetes (Figura 3B). Em seguida, uma alça de aço de 12 mm de diâmetro foi mergulhada numa emulsão fotográfica (Ilford L4 – Polysciences INC.), a qual foi previamente fundida em banho-maria a 42°C e posteriormente diluída em água bidestilada 1:1, e então mantida em banho-maria a 32°C (Figura 3C). O excesso foi retirado com papel absorvente e esperou-se a emulsão solidificar.

Após a solidificação uma monocamada de brometo de prata foi aplicada sobre os cortes ultrafinos que estavam sobre os bastonetes de vidro (Figura 3C e 3D). Esta monocamada é evidenciada pela cor de interferência dourada, que indica a melhor área para ser aplicada sobre o material. As telinhas foram então mantidas a 4°C em caixas pretas vedadas com fita isolante, que foram colocadas no interior de sacos plásticos pretos para evitar o contato com a luz durante 70 dias.

Decorridos 70 dias as telinhas foram colocadas em contato com o revelador Microdol X da Kodak™ durante cinco minutos a uma temperatura de

22°C. Em seguida foi feita uma lavagem com água destilada por 15 segundos e as telinhas foram então colocadas no fixador tiosulfato de sódio 3% durante 2 minutos e 45 segundos, a uma temperatura de 22°C. Deve-se ressaltar que o tempo de fixação é crítico para que a ultra-estrutura do material seja preservada. Após a fixação, o material foi lavado com água bidestilada durante dez minutos.

Então, foi realizada a remoção da parte gelatinosa da emulsão da seguinte forma:

- 1 – três lavagens de 10 minutos em água bidestilada.
- 2 – três lavagens de 30 minutos em água a 37°C.
- 3 – uma lavagem com ácido acético 4% a 37°C.
- 4 – três lavagens de 5 minutos em água bidestilada à temperatura ambiente.

Posteriormente, os cortes foram contrastados de acordo com os seguintes procedimentos:

- 1 - contato com acetato de uranila 2,5% durante 45 minutos (no escuro);
- 2 - três lavagens em água bidestilada durante 20 segundos cada;
- 3 - contato com citrato de chumbo durante dez minutos;
- 4 - uma lavagem de 20 segundos em solução de NaOH 0,01 M;
- 5 - três lavagens em água bidestilada durante 20 segundos cada.

As telinhas contendo os cortes das glândulas pós-faríngeas foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão para obtenção de fotomicrografias.

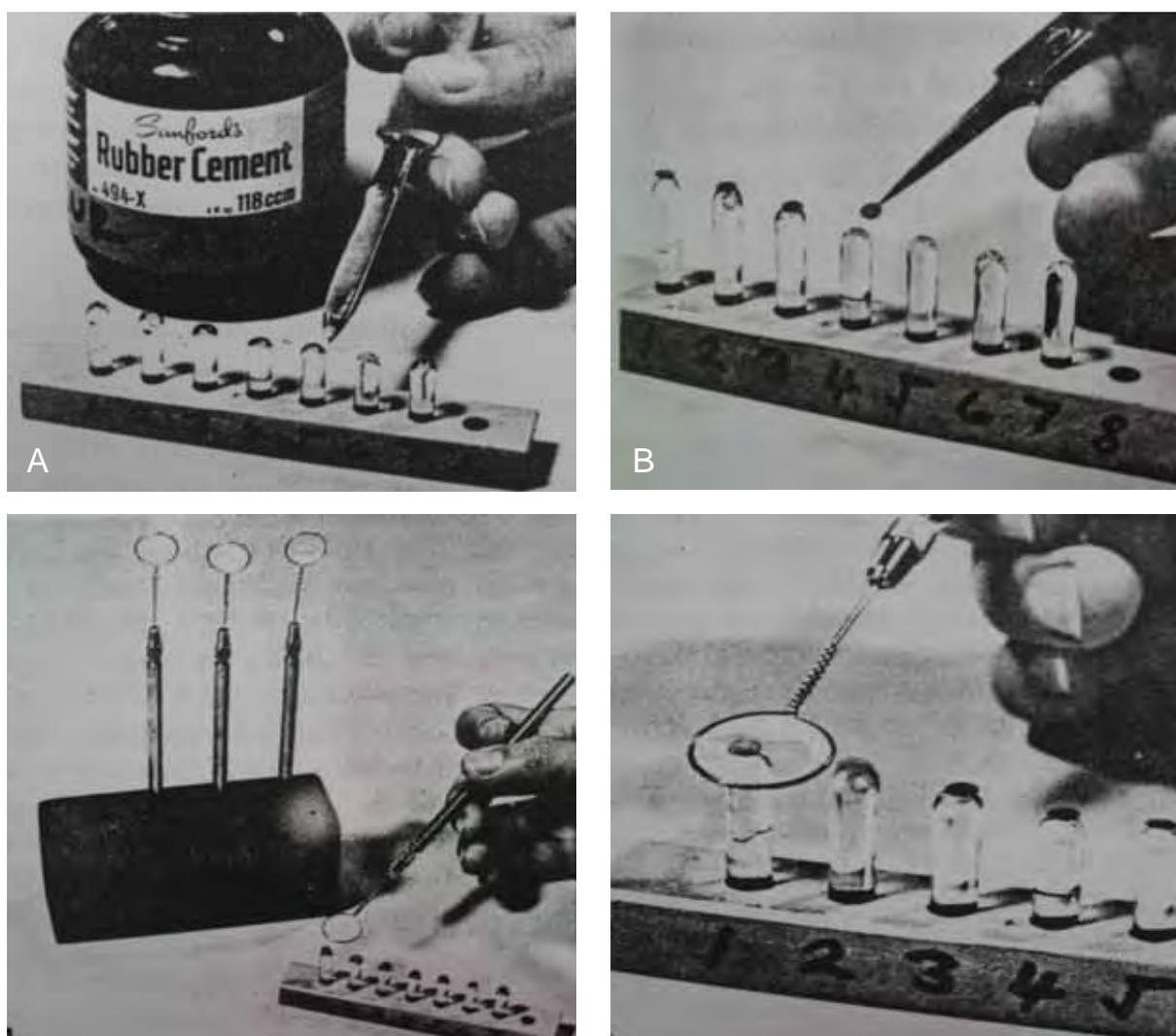


Figura 3. Preparação para cobertura dos cortes para exame utilizando microscopia eletrônica de transmissão autorradiográfica: A – Colocação de cola plástica sobre os bastonetes de vidro; B – Fixação das telinhas contendo os cortes sobre os bastonetes; C – Uma alça de aço foi mergulhada na emulsão fotográfica e posteriormente deixada na posição vertical para a solidificação da emulsão; D – Cobertura dos cortes (Modificado de Bienz 1977).

7. Resultados

7.1. Morfologia das glândulas pós-faríngeas (GPF) - controle

7.1.2. Estereomicroscopia e microscopia eletrônica de varredura

Em todas as espécies estudadas as GPF foram encontradas na região frontal da cabeça, logo acima do cérebro. Elas estão ligadas dorso-lateralmente à região posterior da faringe, logo após a porção terminal da placa hipofaríngea, onde após um curto ducto, bifurcam-se. A morfologia das GPF variou de acordo com a espécie estudada, porém, o seu interior sempre apresentou um líquido com coloração variando de transparente a amarelo-claro.

Apesar de terem sido testadas diferentes formulações dos fixadores utilizados, tanto para microscopia eletrônica de varredura quanto eletrônica de transmissão, o material fotografado revelou que as técnicas usuais de laboratório não apresentaram bons resultados na preservação das GPF das três espécies de formigas utilizadas no presente estudo.

Atta laevigata

Na Figura 4, estão representadas as GPF de uma operária média de *A. laevigata* vistas ao estereomicroscópio. A coloração azul escuro apresentada é devido ao corante (Sudan Black) utilizado para destacá-las.

As GPF de *A. laevigata* são estruturas pares, uma de cada lado no final da faringe, contendo um número variável de projeções digitiformes alongadas com aspecto tubular (Figura 4). Nas operárias médias o número total de digitações observadas variou de 50 a 71, com média igual a 56 ± 6 (média \pm D.P.). As

digitações podem ou não apresentar ramificações. Elas ficam em contato direto com a hemolinfa do inseto e sempre terminam em “fundo cego”.



Figura 4. Fotomicrografia das glândulas pós-faríngeas obtidas ao estereomicroscópio de uma operária média de *Atta laevigata* (vista ventral). As setas indicam a abertura de cada uma das glândulas associadas à região posterior da placa hipofaríngea* (Aumento 40x).

A análise realizada com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura mostrou detalhes que não foram observados ao estereomicroscópio (Figura 5). O epitélio que reveste externamente as GPF de *A. laevigata* apresenta regiões lisas, e outras rugosas, contendo diversas dobras e traquéias por toda a sua extensão (Figura 6)

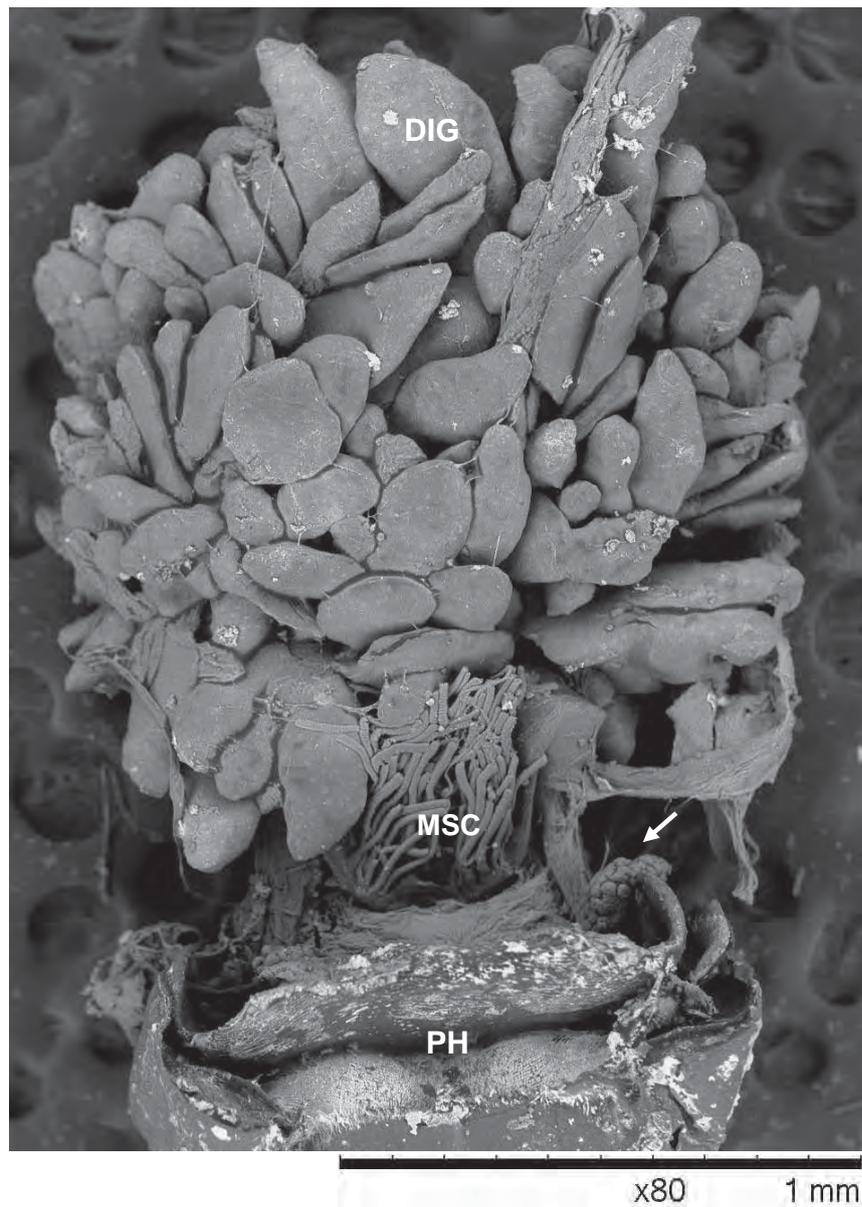


Figura 5. Fotomicrografia ao MEV das glândulas pós-faríngeas de uma operária média de *Atta laevigata* (vista ventral). DIG: digitais; MSC: musculatura associada à placa hipofaríngea (PH); seta: glândulas hipofaríngeas.

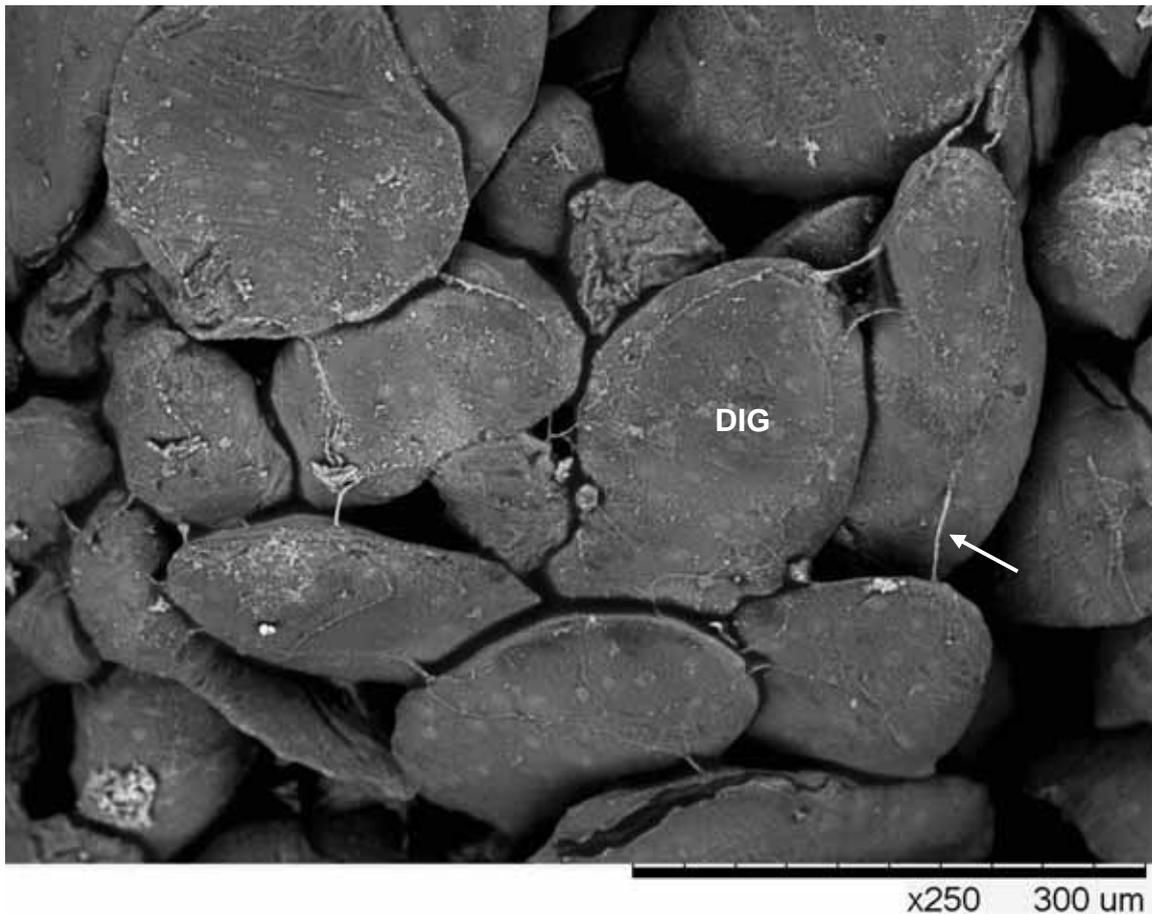


Figura 6. Fotomicrografia ao MEV das glândulas pós-faríngeas de uma operária média de *Atta laevigata* (vista ventral). Detalhe dos feixes musculares (MSC) inseridos na placa hipofaríngea e do epitélio que compõe as digitações (DIG).

Existe uma série de feixes musculares inseridos na placa hipofaríngea das GPF desta espécie (Figuras 5 e 6), os quais estão associados somente à porção inicial do esôfago. Aparentemente, o espaçamento dessa musculatura é diferente em relação às demais espécies estudadas (Figura 5 e 6). Também foi observado um número variável de traquéias distribuídas sobre toda a superfície externa das GPF, tanto de *A. laevigata* quanto das outras duas espécies analisadas (Figura 7).

Além disso, também foi registrado a presença de duas glândulas hipofaríngeas, localizadas lateralmente na região anteroventral da placa hipofaríngea, uma de cada lado (Figura 5 e 8). Elas eram esféricas e formadas por inúmeros alvéolos agrupados, sendo que foi possível perceber que internamente existem canalículos que percorrem as células secretoras e formam um cribelo no ponto de descarga do conteúdo, que neste caso é a própria placa hipofaríngea (Figura 8).

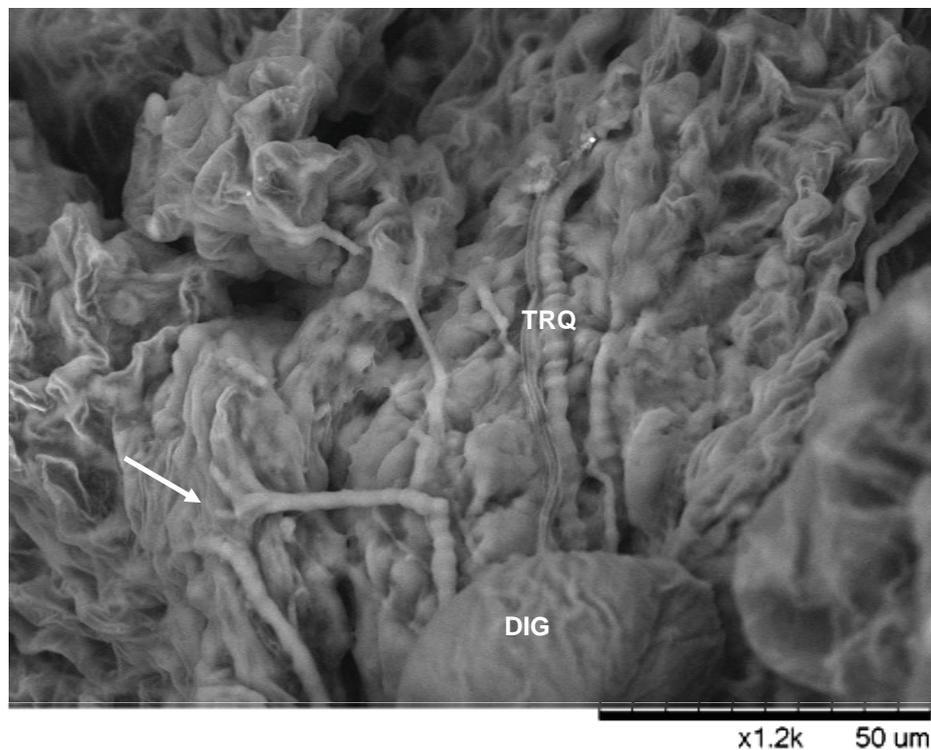


Figura 7. Fotomicrografia ao MEV da superfície de uma das digitações das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata*. Detalhe das traquéias (TRQ) ramificando-se (seta) em direção às digitações (DIG).

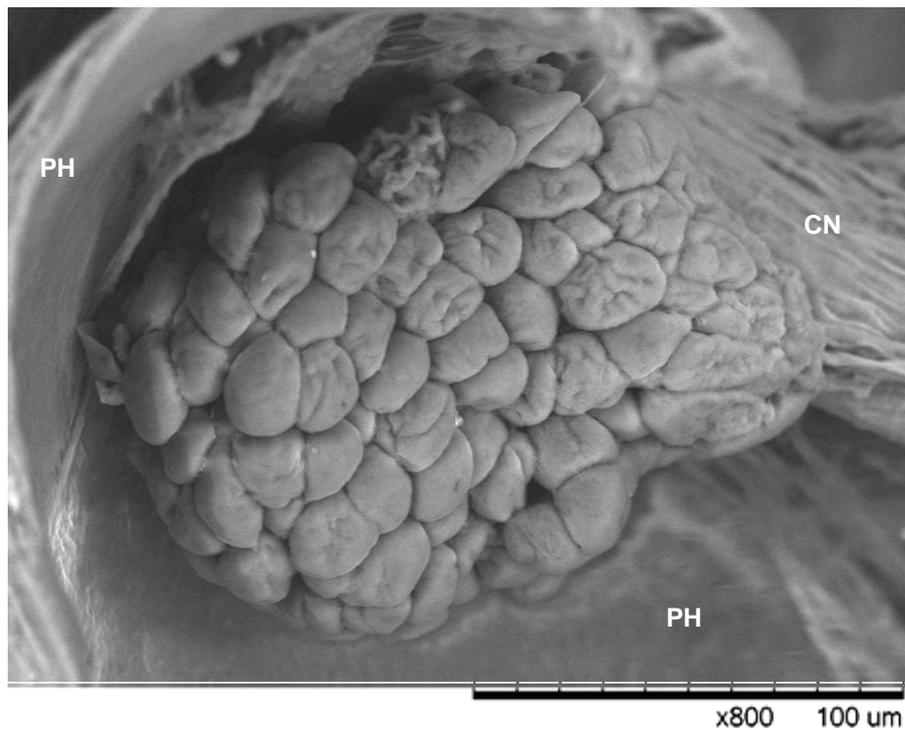


Figura 8. Fotomicrografia ao MEV das glândulas hipofaríngeas de uma operária média de *Atta laevigata*. **CN**: canálculos coletores formando um cribelo; **PH**: placa hipofaríngea.

Camponotus vittatus

Na Figura 9, estão representadas as **GPF** de uma operária média de *C. vittatus* vistas ao estereomicroscópio. A coloração azul escuro apresentada é devido ao corante (Sudan Black) utilizado para destacá-las.

As **GPF** desta espécie também são compostas por um par de glândulas, uma de cada lado, contendo um número variável de projeções digitiformes de aspecto tubular (Figura 9). Nas operárias médias o número total de digitações observadas variou de 40 a 62, com média igual a 51 ± 6.3 (média \pm D.P.). Semelhante ao observado em operárias de *A. laevigata*, as digitações das **GPF** de

C. vittatus podem ou não apresentar ramificações, estão em contato direto com a hemolinfa do inseto e sempre terminam em “fundo cego”. Contudo, as **GPF** dessa espécie possuem uma pequena porção saculiforme em sua base, a qual se ramifica, formando as projeções digitiformes. Neste caso, as digitações são em menor número, as quais estão em menor número que em *A. laevigata*.

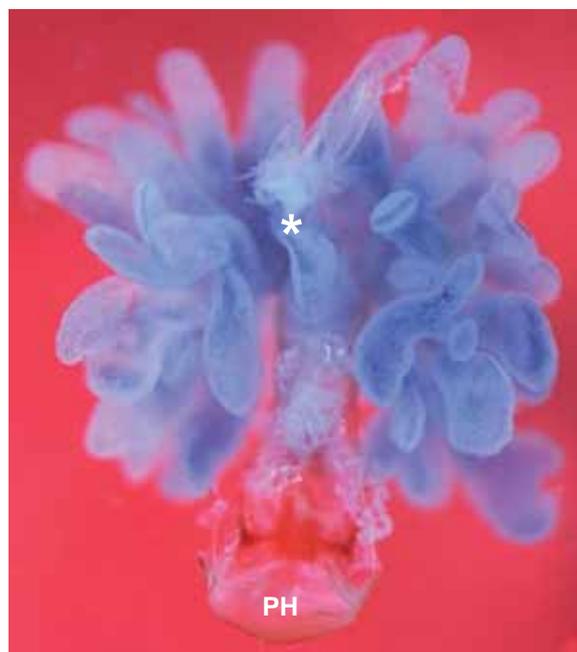


Figura 9 Fotomicrografia das glândulas pós-faríngeas de uma operária média de *Camponotus vittatus* (vista ventral) obtida ao estereomicroscópio. O asterisco indica o início do esôfago. **PH**: placa hipofaríngea (Aumento 50x).

A análise do material utilizando o microscópio eletrônico de varredura confirmou a descrição realizada anteriormente. Semelhante ao encontrado nas operárias de *A. laevigata*, as GPF de *C. vittatus* possuem feixes musculares inseridos na placa hipofaríngea, os quais também estão associados somente à região anterior do esôfago (Figura 10 e 11).

Diferente de *A. laevigata*, o epitélio que reveste externamente as GPF de *C. vittatus* é formado por pequenas projeções e fendas por toda a sua extensão (Figura 11 e 12). É possível que essas características morfológicas aumentem, de alguma forma, a superfície de contato do epitélio com a hemolinfa.

As traquéias encontradas sobre a superfície das glândulas eram alongadas e/ou ramificadas, apresentavam diferentes calibres e, em determinados momentos, penetravam no epitélio (Figura 13 e 14). As glândulas hipofaríngeas encontradas nessa espécie estavam localizadas lateralmente na região anteroventral da placa hipofaríngea, uma de cada lado. As células secretoras também eram esféricas com inúmeros canalículos coletores, contudo, diferente do observado em *A. laevigata*, as glândulas hipofaríngeas de *C. vittatus* eram alongadas e tinham aspecto de cacho, estando ligadas à placa hipofaríngea por meio de um longo canal excretor geral (Figura 15).

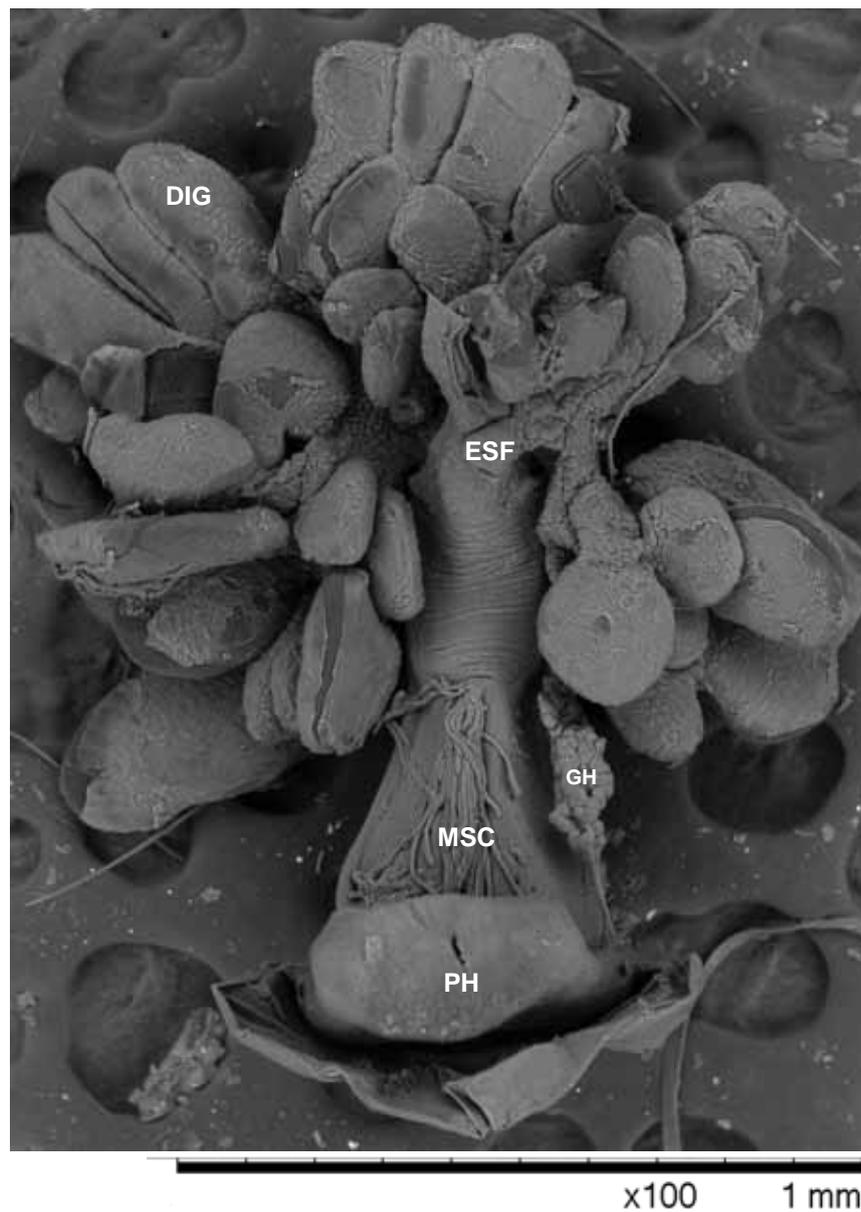


Figura 10. Micrografia ao MEV das glândulas pós-faríngeas de uma operária média de *Camponotus vittatus* (vista ventral). DIG: ditações; ESF: esôfago; GH: glândula hipofaríngea; MSC: musculatura associada à placa hipofaríngea; PH: placa hipofaríngea.

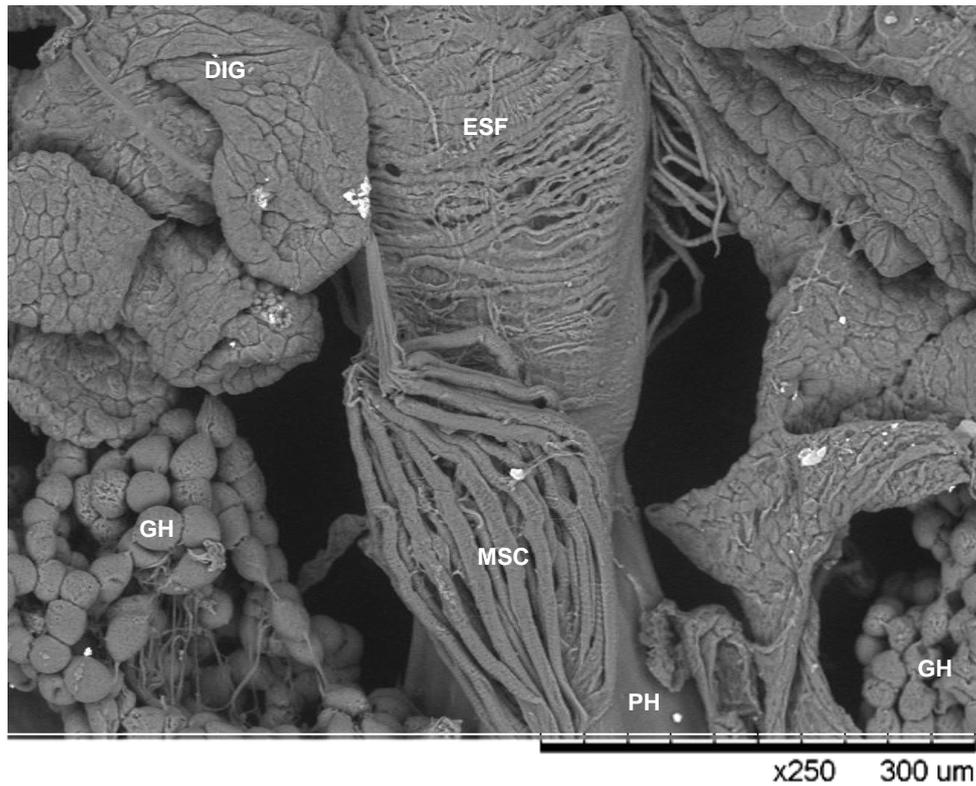


Figura 11. Fotomicrografia ao MEV das glândulas pós-faríngeas de uma operária média de *Camponotus vittatus* (vista ventral). Detalhe da região central. **ESF:** esôfago; **MSC:** musculatura da placa hipofaríngea; **PH:** placa hipofaríngea; **GH:** glândulas hipofaríngeas; **DIG:** digitações.

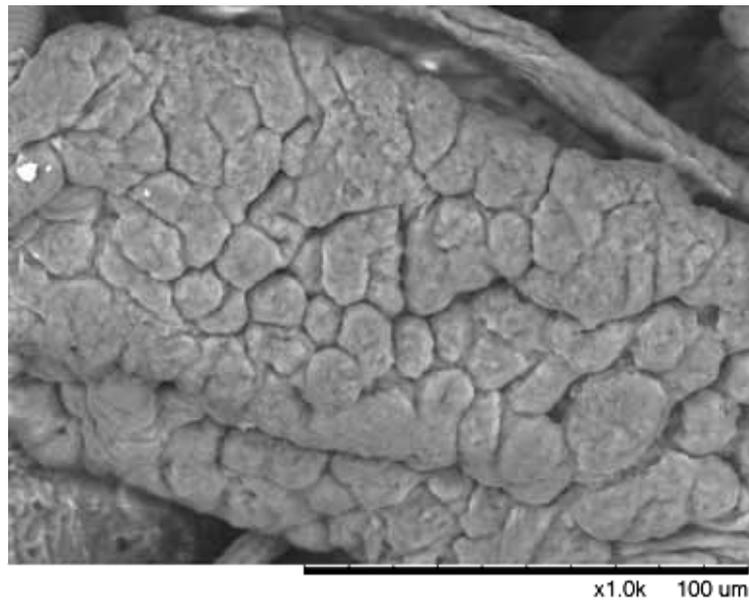


Figura 12. Fotomicrografia ao MEV das glândulas pós-faríngeas de uma operária média de *Camponotus vittatus*. Detalhe da superfície das digitações

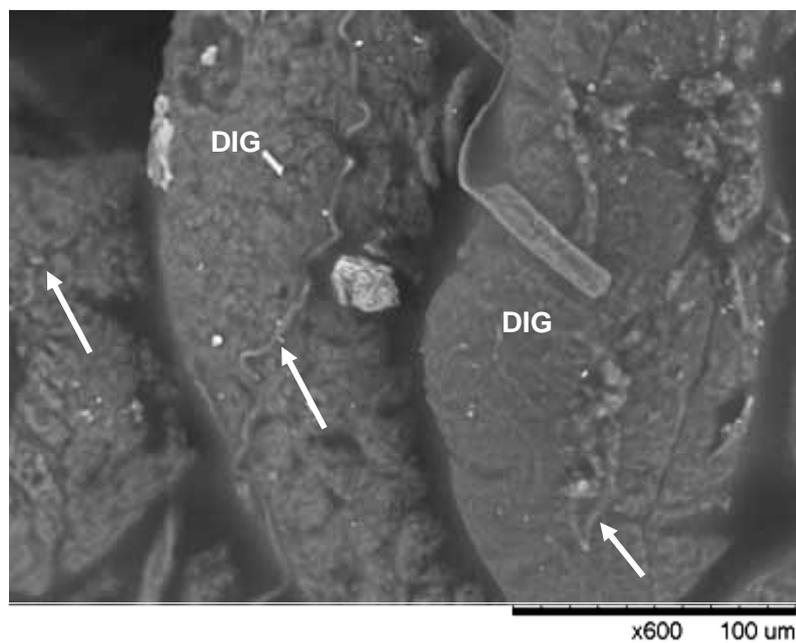


Figura 13. Fotomicrografia ao MEV das glândulas pós-faríngeas de uma operária média de *Camponotus vittatus*. Detalhe das traquéias (**setas**) distribuídas pelo epitélio. **DIG:** digitações.

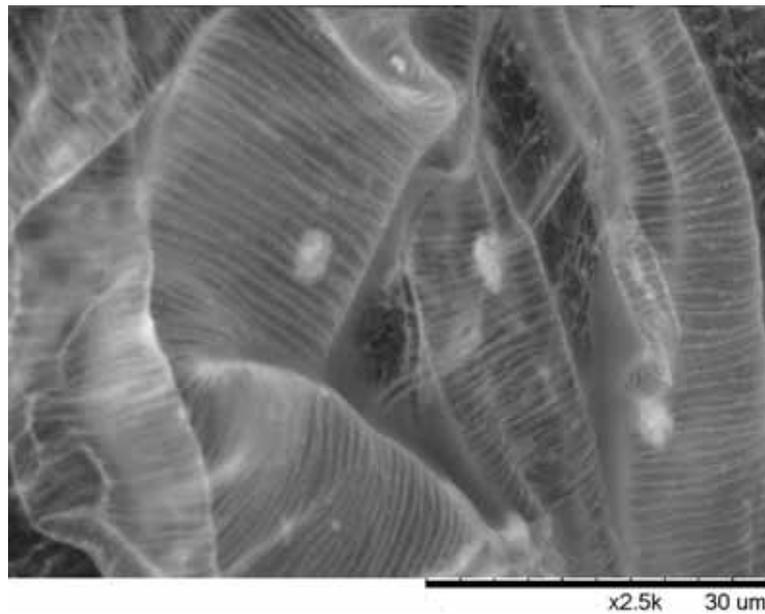


Figura 14. Fotomicrografia ao MEV das glândulas pós-faríngeas de uma operária média de *Camponotus vittatus*. Detalhe das traquéias distribuídas pelo epitélio.

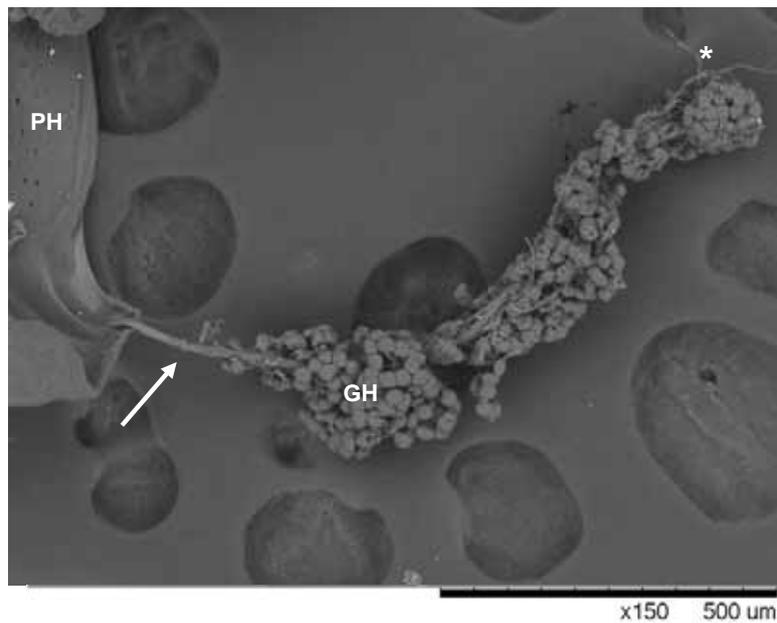


Figura 15. Fotomicrografia ao MEV das glândulas hipofaríngeas de uma operária média de *Camponotus vittatus* (vista ventral). Detalhe da glândula hipofaríngea (GH). PH: placa hipofaríngea; seta: canal excretor ligado à PH; **asterisco**: canaliculos coletores.

Pachycondyla villosa

Na Figura 16, estão representadas as **GPF** de uma operária média de *P. villosa* vistas ao estereomicroscópio. A coloração azul escuro apresentada é devido ao corante (Sudan Black) utilizado para destacá-las.

Diferente das demais espécies, as **GPF** das operárias de *P. villosa* não apresentam digitações, mas sim, um par de glândulas lobadas divididas em duas porções, uma superior e outra inferior, que podem estar dobradas uma sobre a outra (Figura 16A). Na Figura 16B é possível observar que os lobos não estão sobrepostos e que existe um acúmulo de material de origem lipídica que recobre grande parte da superfície externa da glândula; fato não observado nas outras espécies de formigas analisadas. É possível dizer que este material é de origem lipídica já que durante as dissecações foi observado traços de Sudan Black neste local (Figura 16 e 17).

A análise ultramorfológica confirmou que as **GPF** de *P. villosa* possuem um par de lóbulos, cada um deles composto por uma porção superior e outra inferior (Figura 18). O epitélio que reveste as **GPF** é constituído por projeções de forma oval em toda a sua extensão. A característica mais marcante observada em relação a este epitélio é que em determinadas regiões as projeções ovaladas possuem uma abertura na região central, que pode ser arredondada ou em forma de fenda (Figura 19 e 20).

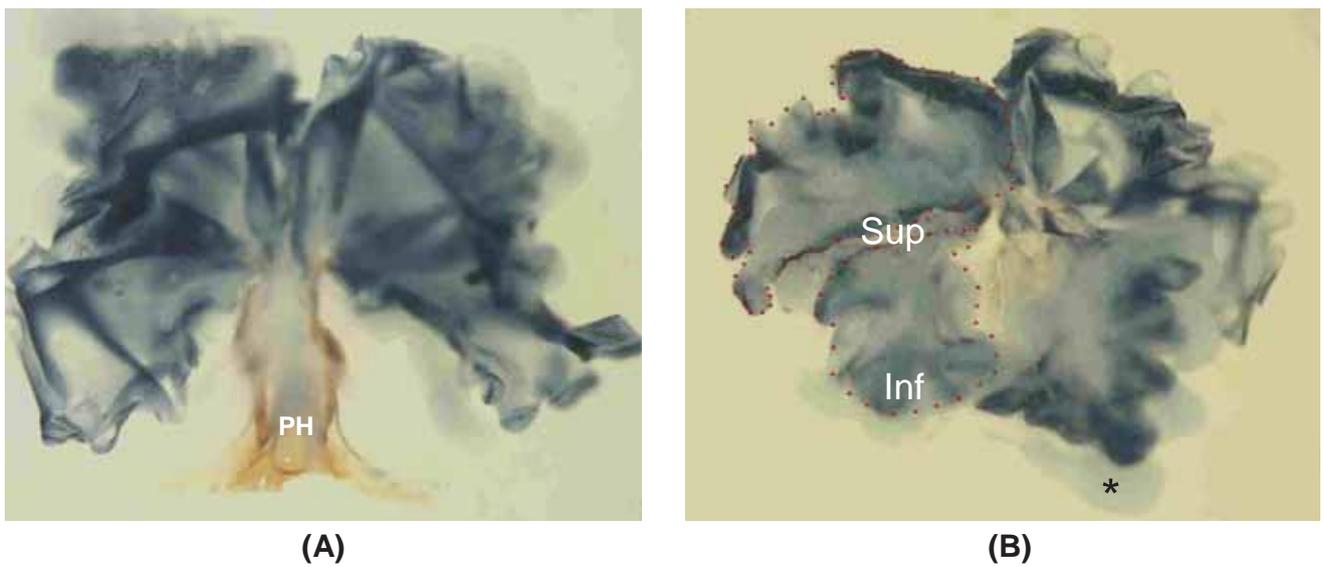


Figura 16. Fotomicrografia das glândulas pós-faríngeas de uma operária de *Pachycondyla villosa*. A- vista ventral, com os lobos dobrados um sobre o outro; PH: placa hipofaríngea. B- vista ventral, destacando as porções superior (Sup) e inferior (Inf) (pontilhados); Asterisco - material de origem lipídica acumulado sobre a superfície externa das glândulas (Aumento 40x).

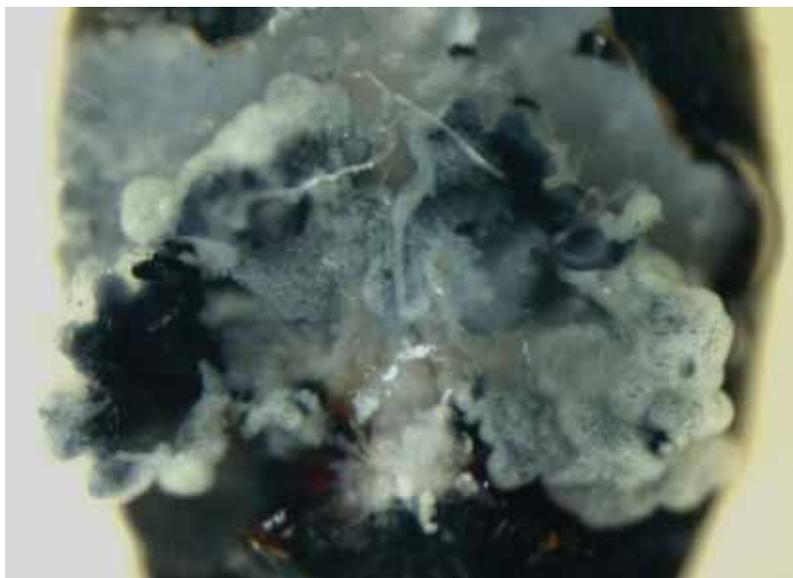


Figura 17. Fotomicrografia da cabeça de uma operária de *Pachycondyla villosa* dissecada na região frontal. Detalhe das glândulas pós-faríngeas coradas de azul pelo Sudan Black e do tecido que recobre sua superfície (Aumento 50x).

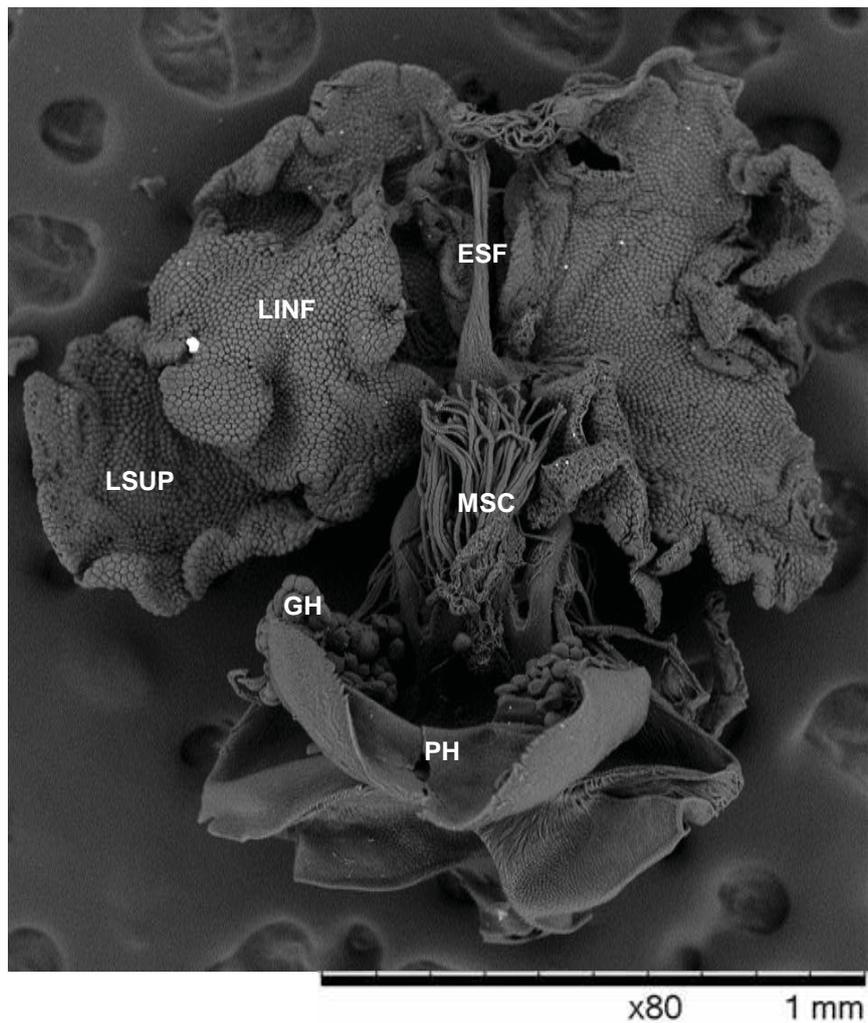


Figura 18. Fotomicrografia ao MEV das glândulas pós-faríngeas de uma operária de *Pachycondyla villosa* (vista ventral). **ESF:** esôfago; **MSC:** musculatura da placa hipofaríngea; **PH:** placa hipofaríngea; **GH:** glândulas hipofaríngeas; **LINF:** lóbulo inferior; **LSUP:** lóbulo superior.

Além disso, em determinadas regiões próximas a essas projeções, o epitélio parece ter sido rompido por completo. Na Figura 20, é possível observar três regiões distintas, uma região em que o epitélio parece não ter sofrido danos, outra em que as projeções estão parcialmente rompidas, e uma outra região onde é evidente ter havido rompimento celular.

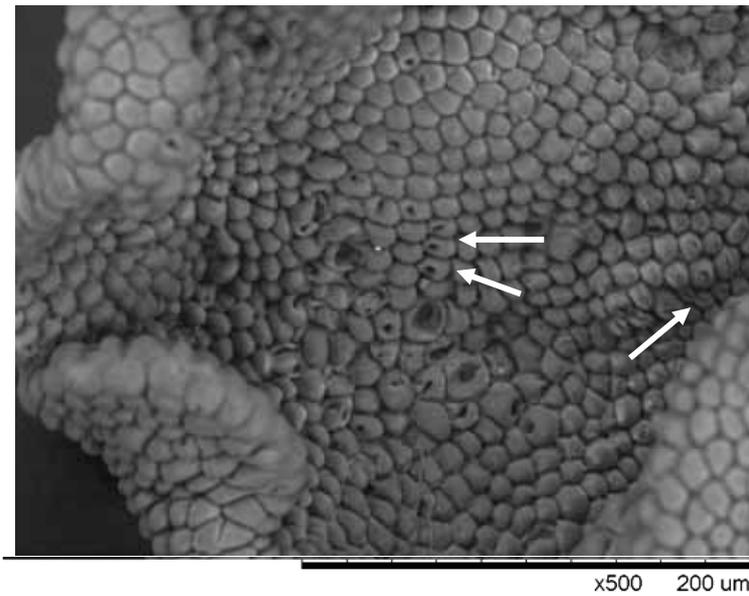


Figura 19. Fotomicrografia ao MEV das glândulas pós-faríngeas de uma operária de *Pachycondyla villosa*. Detalhe do epitélio contendo projeções ovaladas: **seta simples**: projeções com abertura em fenda; **seta dupla**: projeções com abertura circular.

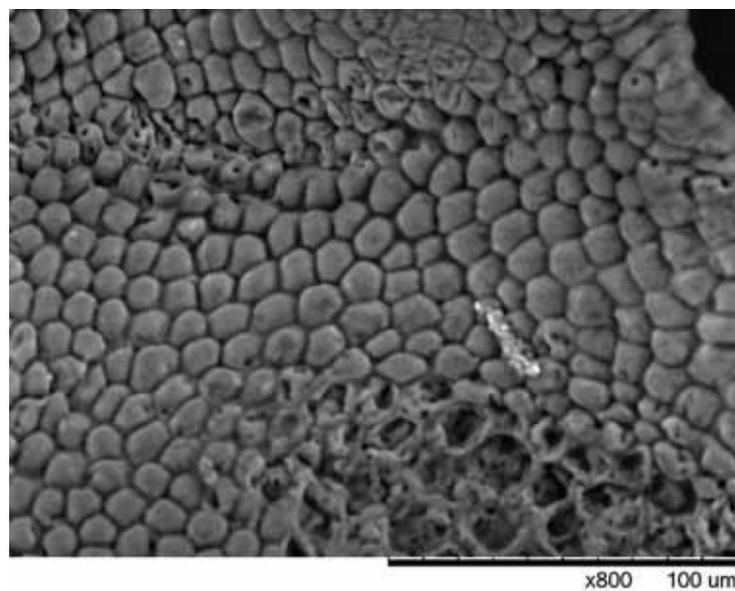


Figura 20. Fotomicrografia ao MEV das glândulas pós-faríngeas de uma operária de *Pachycondyla villosa*. Detalhe do epitélio apresentando três regiões distintas: superior – epitélio parcialmente rompido; mediana – epitélio sem alterações; inferior – epitélio rompido.

Ainda em relação a estas projeções epiteliais, é possível também que esteja ocorrendo a saída de material por estas aberturas encontradas no epitélio das GPF das operárias de *P. villosa* (Figura 21).

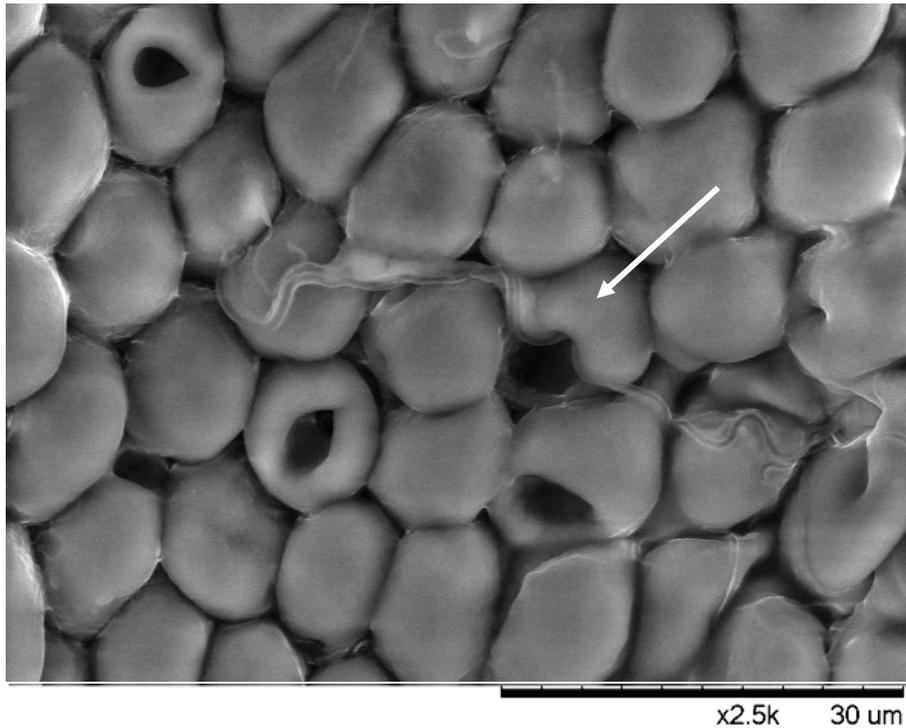


Figura 21. Fotomicrografia ao MEV das glândulas pós-faríngeas de uma operária de *Pachycondyla villosa*. Detalhe de uma célula eliminando material do interior do epitélio (seta).

Os feixes musculares inseridos na placa hipofaríngea são justapostos entre si e semelhantes aos encontrados em *A. laevigata* (Figura 22). Um detalhe não observado nas demais espécies analisadas são as ramificações próximas ao início do esôfago, as quais são ductos que desembocam no lúmen das GPF das operárias de *P. villosa* (Figura 22).

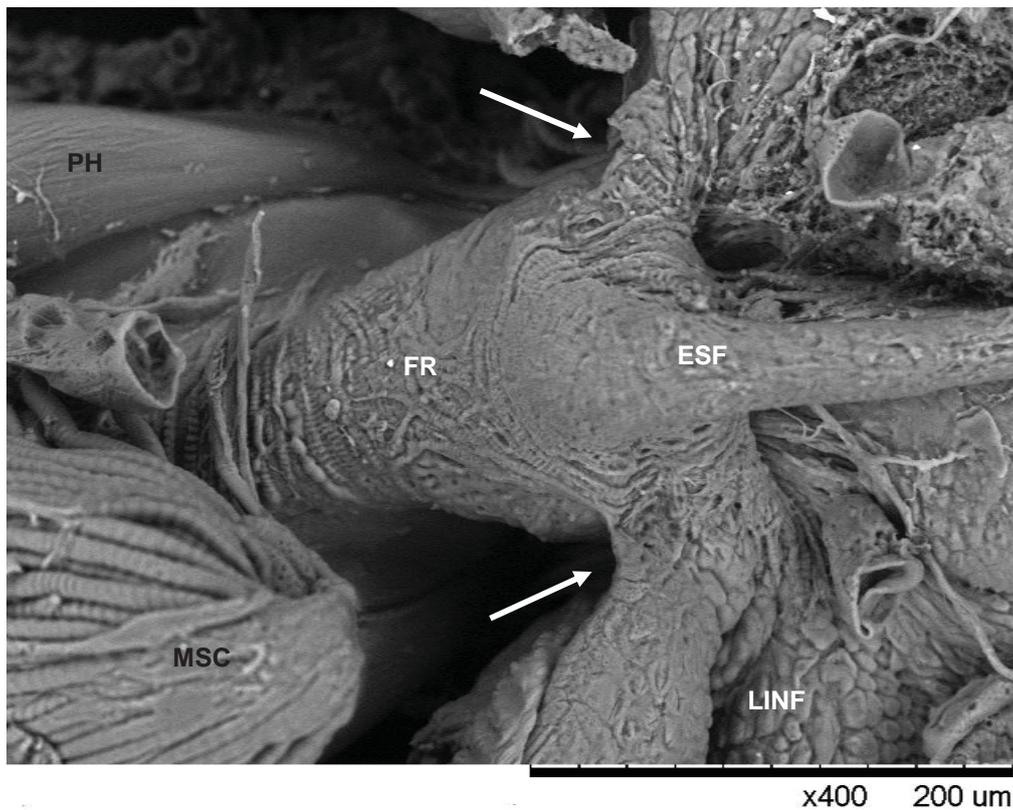


Figura 22. Fotomicrografia ao MEV das glândulas pós-faríngeas de uma operária de *Pachycondyla villosa* (vista ventral). Detalhe das ramificações presentes no esôfago (setas). ESF: esôfago; MSC: musculatura da placa hipofaríngea; PH: placa hipofaríngea; LINF: lóbulo inferior; FR: faringe.

7.1.3. Microscopia de luz

A morfologia das GPF variou de acordo com a espécie estudada, entretanto, foi observado que a organização básica do epitélio é semelhante nas três espécies.

Atta laevigata

O epitélio das projeções digitiformes das **GPF** de *A. laevigata* é constituído de apenas uma camada de células, podendo estar achatadas ou altas com reentrâncias, e apresentam uma cutícula conspícua em sua região apical (Figura 23). A presença de reentrâncias foi comum por todo epitélio das **GPF**, o núcleo das células é proporcionalmente maior que nas demais espécies estudadas, e o citoplasma com poucas organelas.

Na maioria dos casos em que o lúmen das digitações estava cheio o núcleo era de aspecto elíptico (Figura 24), ao passo que, nas regiões em que o lúmen apresentava pouco material em seu interior, o núcleo era arredondado (Figura 23).

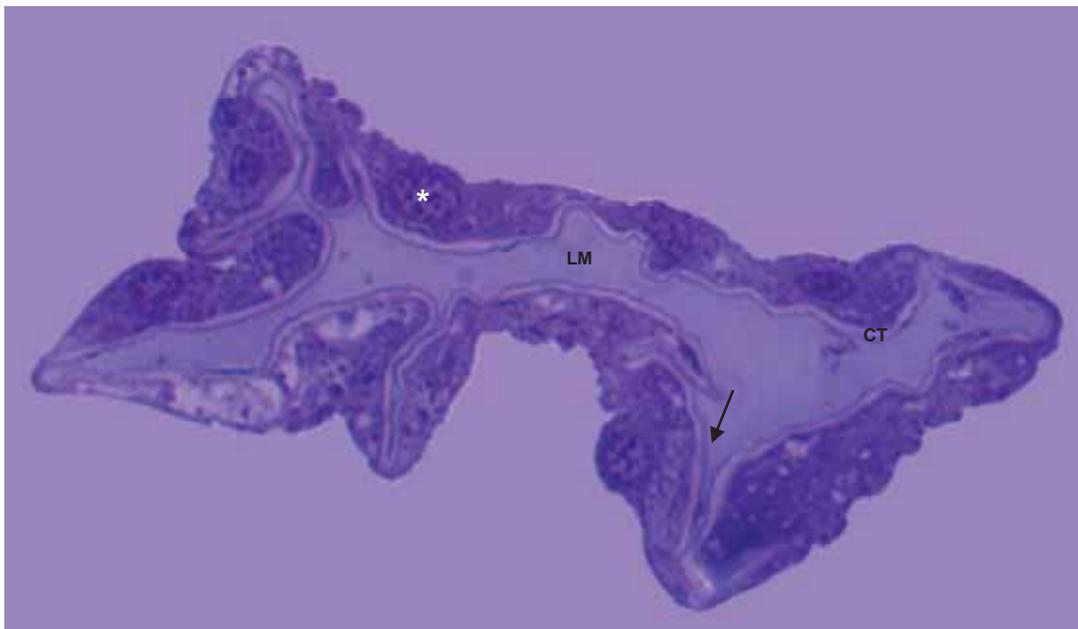


Figura 23. Fotomicrografia do corte histológico de uma das digitações das glândulas pós-faríngeas de uma operária média de *Atta laevigata*. CT: cutícula; LM: lúmen; asterisco: núcleo; seta: reentrância do epitélio (Aumento 1000x).

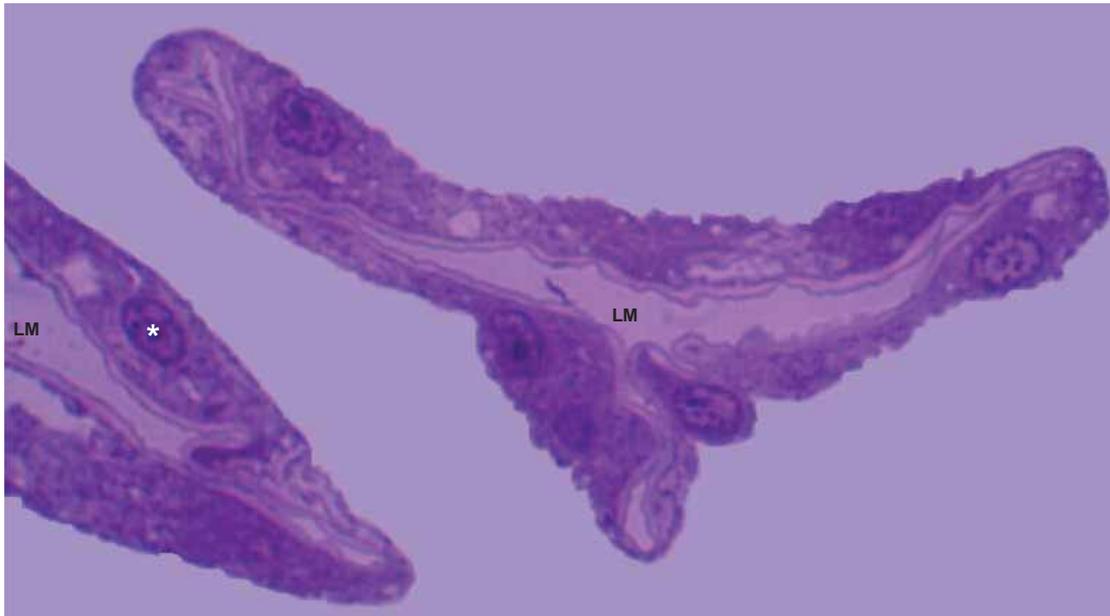


Figura 24. Fotomicrografia do corte histológico de uma digitação das glândulas pós-faríngeas de uma operária média de *Atta laevigata* turgida. **LM:** lúmen; **asterisco:** núcleo (Aumento 1000x).

Camponotus vittatus

Semelhante ao observado em *A. laevigata*, as **GPF** de *C. vittatus* são constituídas por projeções digitiformes e o epitélio é simples, entretanto, constituído de apenas células altas e sem reentrâncias. O núcleo das células é proporcionalmente menor em relação ao citoplasma do que nas outras espécies estudadas, sendo que o citoplasma apresentou algumas organelas e vesículas em número reduzido. Semelhante às demais espécies, a região apical do epitélio possui uma cutícula conspícua revestindo o lúmen das digitações (Figura 25).

Pachycondyla villosa

O epitélio das **GPF** de *P. villosa* também é simples com células altas ou achatadas, entretanto, não foram observadas muitas reentrâncias. O núcleo das células é conspícuo, porém menor que o observado em *A. laevigata*, o citoplasma continha diferentes organelas e inúmeras vesículas. E semelhante às demais espécies a região apical do epitélio das **GPF** de *P. villosa* apresenta uma cutícula revestindo o lúmen (Figura 26).

Independente do lúmen das **GPF** estar cheio ou vazio foram observados apenas núcleos arredondados, que ocupavam somente uma pequena parte do citoplasma. Na maioria das vezes, nas regiões em que era possível observar o núcleo, o epitélio encontrava-se mais alto e existiam inúmeras vesículas preenchendo grande parte do citoplasma, provavelmente contendo lipídeos em seu interior. Neste caso, o núcleo das células sempre estava deslocado para próximo da região basal (Figura 27).

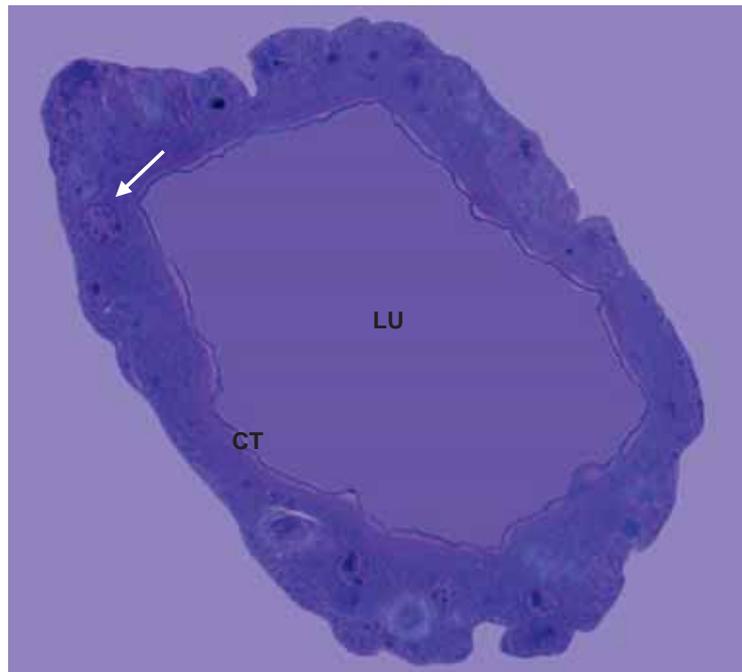


Figura 25. Fotomicrografia do corte histológico de uma das digitações das glândulas pós-faríngeas de uma operária média de *Camponotus vittatus*. CT: cutícula; LU: lúmen; **seta**: núcleo (Aumento 1000x).



Figura 26. Fotomicrografia do corte histológico de um dos lóbulos das glândulas pós-faríngeas de uma operária de *Pachycondyla villosa*. CT: cutícula; LU: lúmen; NC: núcleo; **seta**: vesícula (Aumento 500x).

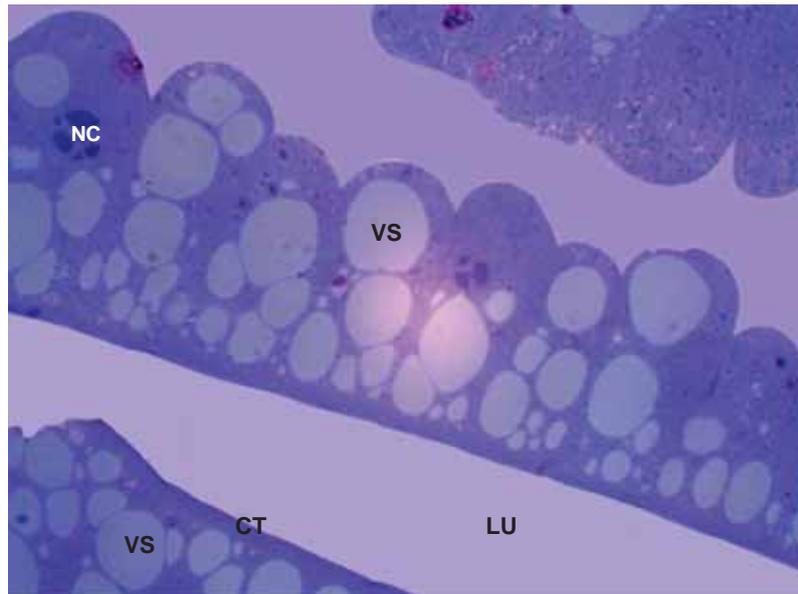


Figura 27. Fotomicrografia do corte histológico de um dos lóbulos das glândulas pós-faríngeas túrgidas de uma operária de *Pachycondyla villosa*. **NC:** núcleo; **LU:** lúmen; **CT:** cutícula; **VS:** vesículas (Aumento 1000x).

7.1.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise ultraestrutural confirmou que o epitélio das GPF de todas as espécies analisadas é constituído por apenas uma camada de células com dobras por toda a sua extensão, como observado ao microscópio de luz (Figura 28, 35 e 39). A cutícula que reveste a região apical das GPF de *A. laevigata* é espessa e semelhante à encontrada em *C. vittatus*, ao passo que em *P. villosa* ela é menos espessa. Em ambos os casos foi possível observar que essa cutícula apresenta três camadas: epicutícula – camada mais externa, diretamente em contato com o lúmen das GPF, delgada e mais eletrodensa; exocutícula – camada intermediária, mais espessa que a epicutícula e menos eletrodensa; endocutícula – camada mais interna, e neste caso menos espessa que a exocutícula, e menos eletrodensa que as demais (Figura 30, 36B e 40). A membrana basal é acelular e está diretamente em contato com a hemolinfa do inseto, revestindo praticamente

todas as dobras das GPF (Figura 32, 35 e 44). Além disso, não foram observadas junções celulares como desmossomos, hemidesmossomos e junções comunicantes (“gap junctions”) no epitélio das GPF em nenhuma das espécies analisadas.

Atta laevigata

Foi observado que nas células que apresentavam uma forma achatada o núcleo era de forma elíptica e estava geralmente disposto na região central do epitélio (Figura 28). Na região do epitélio em que as células eram altas, os núcleos tinham forma arredondada e estavam geralmente localizados próximos à região basal (Figura 29). Em ambos os casos, o envoltório nuclear continha poucas dobras e alguns poros, sendo possível visualizar regiões de heterocromatina e eucromatina em seu interior.

A membrana plasmática na região apical das células, aquela que está próxima ao lúmen, apresenta poucas vilosidades que podem ser curtas ou alongadas em direção à região mediana do epitélio. Também foi possível observar especializações da membrana plasmática, os contatos focais (Figura 31).

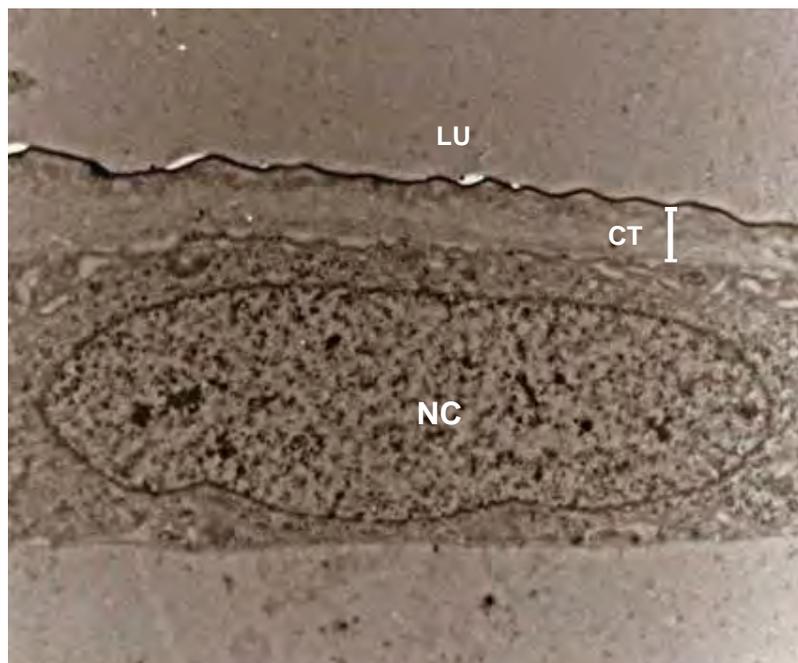


Figura 28. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata*. Detalhe de uma célula achatada. CT: cutícula; LU: lúmen; NC: núcleo (Aumento 2050x).

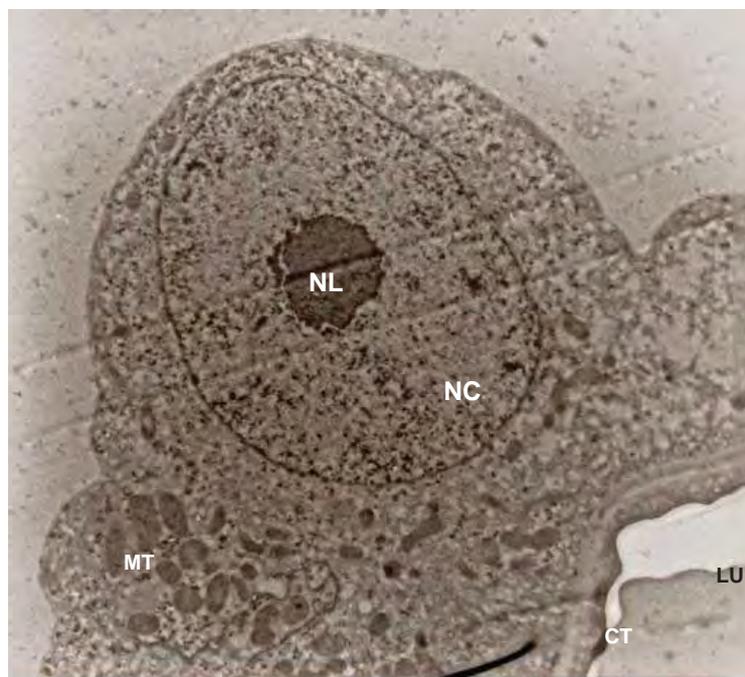


Figura 29. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata*. Detalhe de uma célula alta. CT: cutícula; LU: lúmen; MT: mitocôndrias; NC: núcleo; NL: nucléolo (Aumento 2050x).

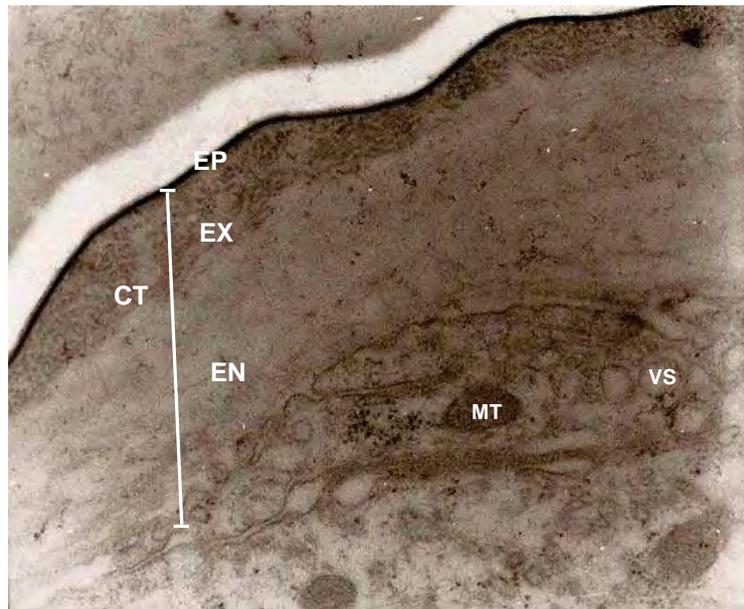


Figura 30. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata*. Detalhe da região apical. CT – cutícula; EP – epicutícula; EX – exocutícula; EN: endocutícula; LU: lúmen; MT: mitocôndria; VS: vesículas (Aumento 8200x).

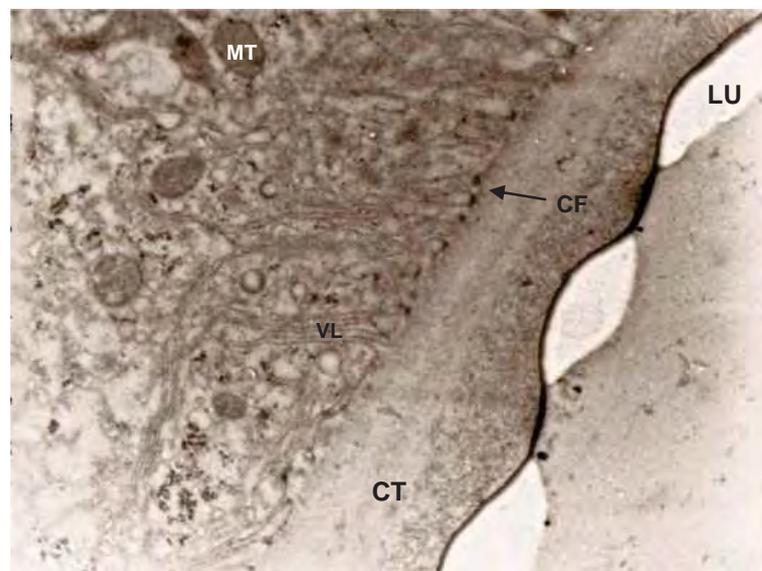


Figura 31. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata*. Região apical e mediana. CT: cutícula; CF: contato focal; LU: lúmen; MT: mitocôndria; VL: vilosidades (Aumento 5400x).

No contato entre células adjacentes, as membranas plasmáticas têm aspecto sinuoso e apresentam inúmeras junções septadas, sendo comum a formação de vesículas no espaço intercelular (Figura 32, 33 e 34).

O citoplasma das células é relativamente simples, apresentando algumas organelas, como exemplo, mitocôndrias de diferentes formas e ribossomos livres, além de uma grande quantidade de vesículas e grânulos, ambos com diferentes eletrondensidades (Figura 32).

As mitocôndrias estão dispersas por todo o citoplasma, podendo ser arredondadas ou de forma alongada, e com cristas pouco visíveis. Também foram observadas mitocôndrias contendo vesículas em seu interior, e em alguns casos, em processo de divisão (Figura 32 e 34).

Tanto o retículo endoplasmático granuloso (**REG**) quanto o liso (**REL**) estavam presentes em baixa quantidade. Apesar disso, quando presente, o **REG** localizava-se próximo ao núcleo formando um agrupamento de túbulos longitudinais com ribossomos aderidos às suas membranas (Figura 32). Por outro lado, o **REL**, quando presente, foi encontrado distribuído por toda a célula formando uma rede tubular bastante característica (Figura 34).

Os ribossomos são abundantes e foram encontrados por todo o epitélio sob a forma de rosetas (ribossomos livres), justapostos ao retículo endoplasmático granuloso ou formando poliribossomos (Figura 32, 33 e 34, respectivamente).



Figura 32. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata*. Detalhe da região basal e mediana. EI – espaço intercelular; MB: membrana basal; MP: membrana plasmática; MT: mitocôndria; NC: núcleo; **seta**: ribossomos em forma de roseta (Aumento 5400x).

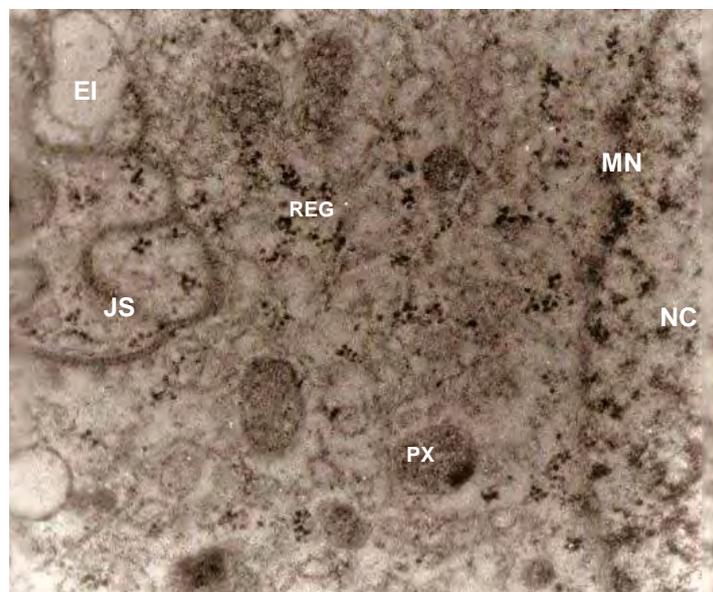


Figura 33. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata*. Detalhe da região mediana. EI – espaço intercelular; MN – membrana nuclear; JS: junções septadas; NC: núcleo; PX: peroxissomo; REG: retículo endoplasmático granuloso (Aumento 10500x).

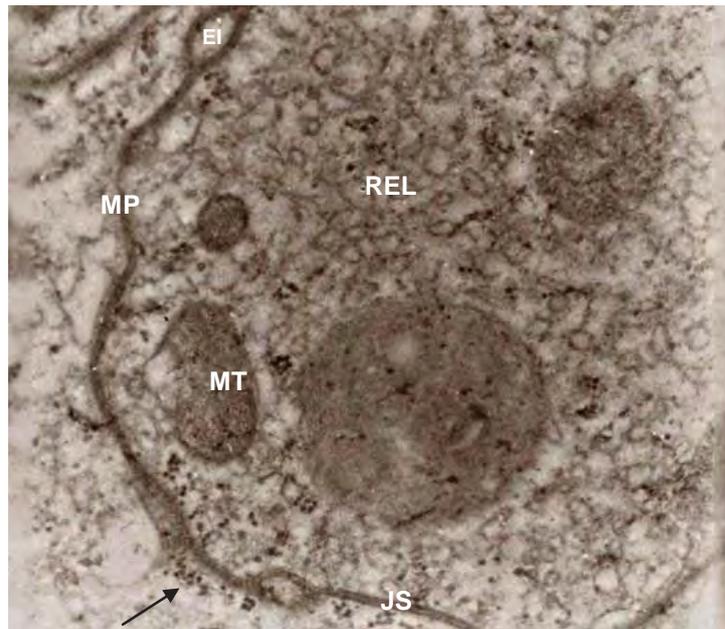


Figura 34. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata*. Detalhe da região mediana. EI – espaço intercelular; JS – junções septadas; MT: mitocôndria; MP: membrana plasmática; REL: retículo endoplasmático liso; **seta:** poliribossomos (Aumento 10500x).

A análise das GPF de *A. laevigata* também revelou a presença de peroxissomos (Figura 33), que são vesículas com apenas uma membrana e apresentam uma forma esférica ou ovóide, geralmente menores que as mitocôndrias. A matriz dos peroxissomos de *A. laevigata* apresenta uma textura finamente granular, e em todos os casos foi observado uma região mais eletrondensa que a matriz.

Camponotus vittatus

O epitélio encontrado nas GPF dessa espécie é relativamente mais largo que o observado em *A. laevigata* e *P. villosa*, porém sem reentrâncias, as células eram altas com núcleo, na maioria das vezes, arredondado (Figura 35). Apesar da

cutícula que reveste a região apical do epitélio ser semelhante à encontrada em *A. laevigata*, a quantidade de vilosidades e contatos focais associados a ela foi a maior encontrada em todas as espécies (Figura 36A). O núcleo apresentou poucas dobras, alguns poros e regiões de heterocromatina e eucromatina em seu interior. Contudo, diferente das demais espécies, ele foi encontrado nas três regiões do epitélio: apical, mediana e basal; sendo possível, em alguns casos, observar o espaço perinuclear de suas duas membranas (Figura 37).

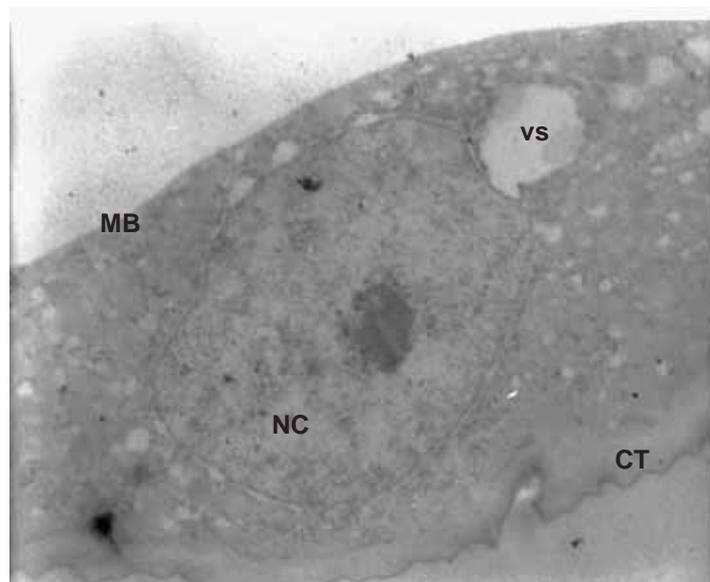


Figura 35. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *C. vittatus*. Vista geral do epitélio. CT: cutícula MB: membrana basal; NC: núcleo; VS: vesícula (Aumento 2050x).

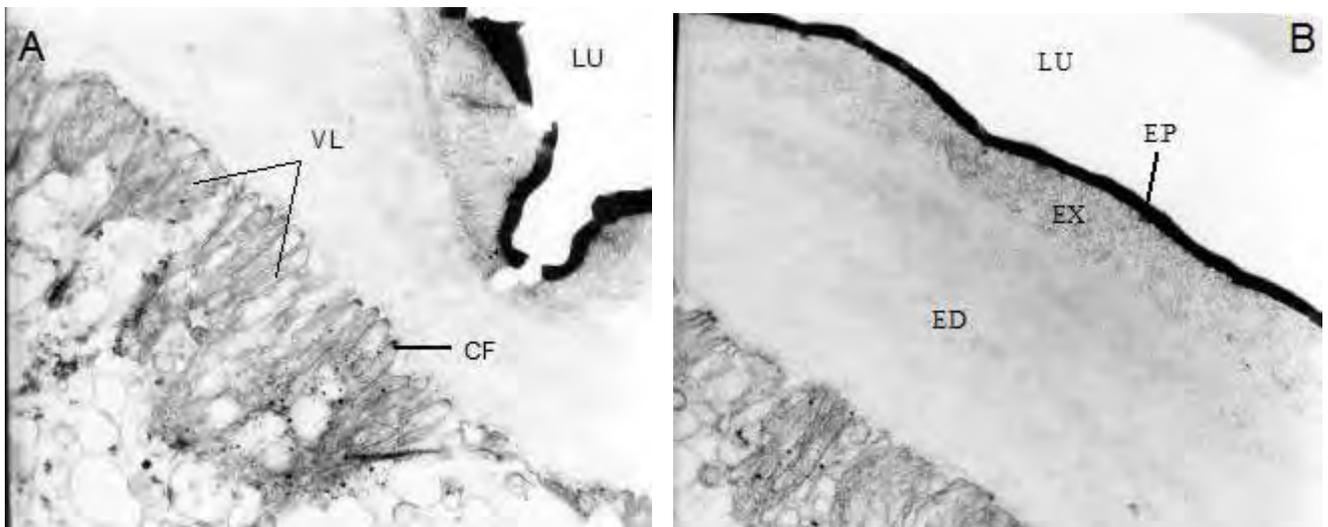


Figura 36. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *C. vittatus*. Detalhe da região apical. LU: lúmen; VL: vilosidades; CF: contato focal; EP: epicutícula; EX: exocutícula; ED: endocutícula (Aumento: 5400x).

O aspecto geral do citoplasma das células é bastante simples, e comparado com *A. laevigata* e *P. villosa*, ele continha um número menor de estruturas e organelas. As organelas mais abundantes foram os ribossomos e mitocôndrias, os peroxissomos estavam em baixa quantidade, e não foram encontrados retículo endoplasmático, complexo golgiense ou lisossomos. Entretanto, foi registrado a presença de glicogênio no interior de vacúolos somente nesta espécie (Figura 38).

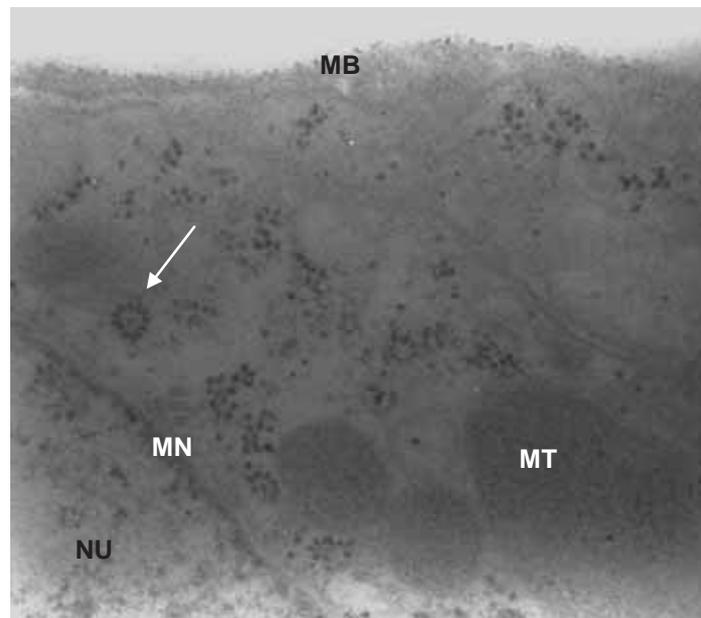


Figura 37. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *C. vittatus*. Detalhe da região basal. MN – membrana nuclear (espaço perinuclear); MT – mitocôndria; MB – membrana basal; **seta** - poliribossomos (Aumento 3100x).

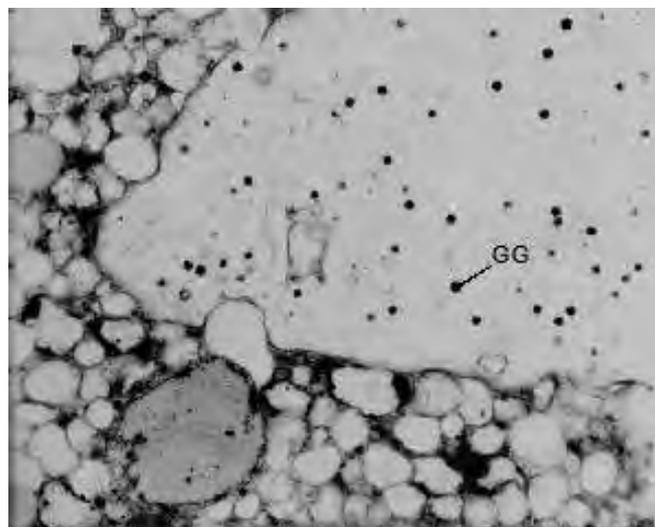


Figura 38. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *C. vittatus*. Detalhe da região mediana. GG: glicogênio; vs: vesículas (Aumento 5400x).

Pachycondyla villosa

Diferente do encontrado para *A. laevigata*, a forma do núcleo não variou de acordo com a forma das células (achatadas ou altas), eles eram todos arredondados e estavam localizados entre a região basal e mediana do epitélio. Seu envoltório praticamente não continha dobras e possuía alguns poros, sendo possível visualizar regiões de heterocromatina e eucromatina em seu interior, além de dois ou mais nucléolos (Figura 39).

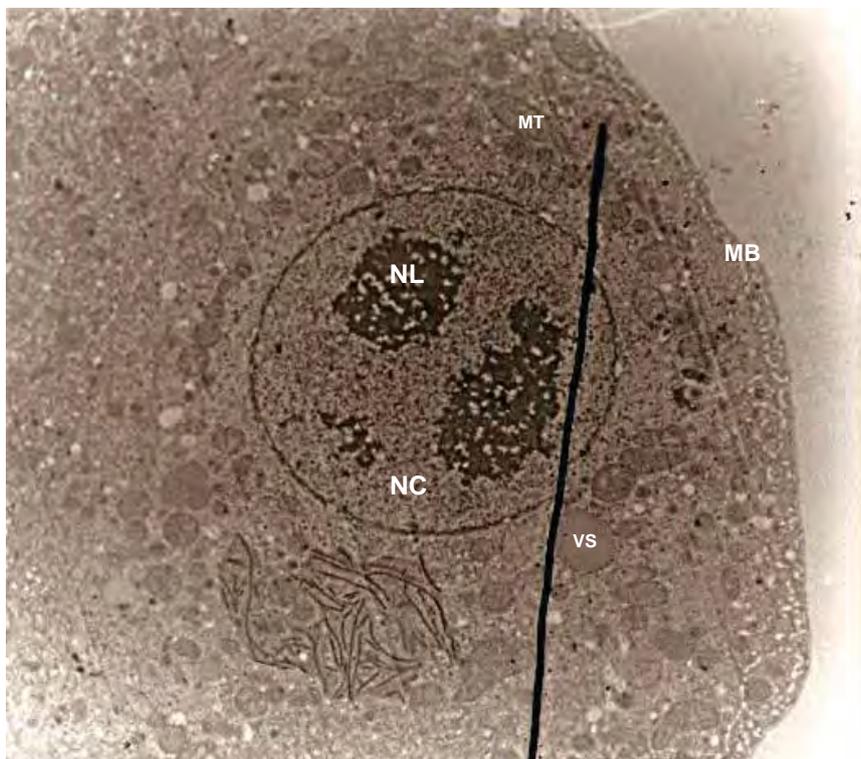


Figura 39. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *P. villosa*. Vista geral. CT: cutícula; MB: membrana basal; MT: mitocôndria; NC: núcleo; NL: nucléolo; vs: vesícula (Aumento 1450x).

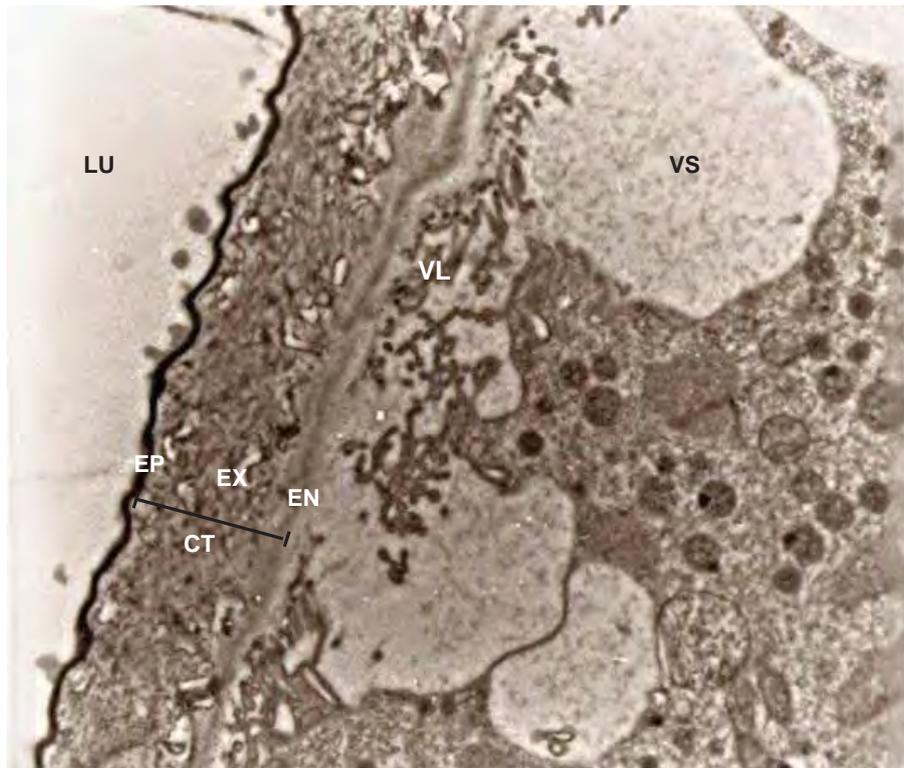


Figura 40. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *P. villosa*. Detalhe da região apical. LU: lúmen; CT: cutícula; EP: epicutícula; EX: exocutícula; EN: endocutícula; VL: vilosidades; VS: vesícula (Aumento 2900x).

Diferente de *C. vittatus*, a membrana plasmática na região apical das células de *P. villosa* apresentam muitas vilosidades que, na maioria dos casos, eram longas e se estendiam desde a cutícula até a região mediana do epitélio local em que foram encontradas inúmeras vesículas e contatos focais (Figura 42).

Semelhante ao observado para *A. laevigata*, o contato das membranas plasmáticas entre células adjacentes de *P. villosa* têm aspecto sinuoso e apresentam inúmeras junções septadas, sendo comum a formação de vesículas no espaço intercelular (Figura 41).

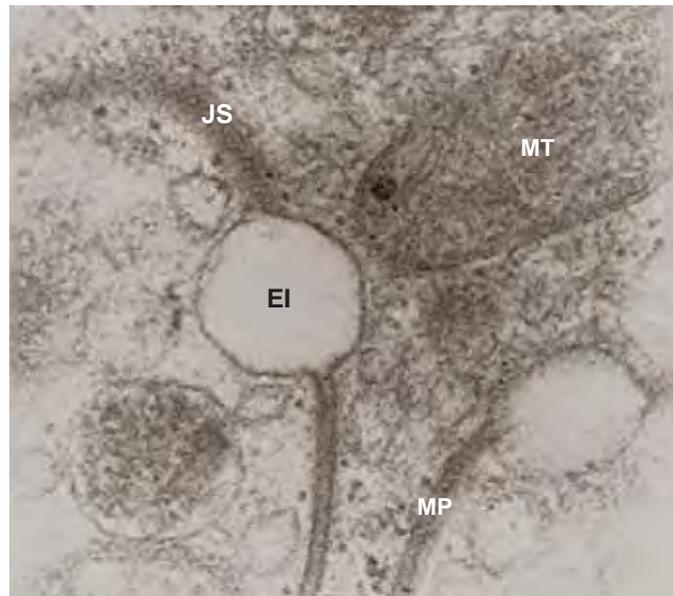


Figura 41. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *P. villosa*. Detalhe do contato entre células adjacentes. EI: espaço intercelular; MP: membrana plasmática; MT: mitocôndria; JS: junções septadas (Aumento 21500x).

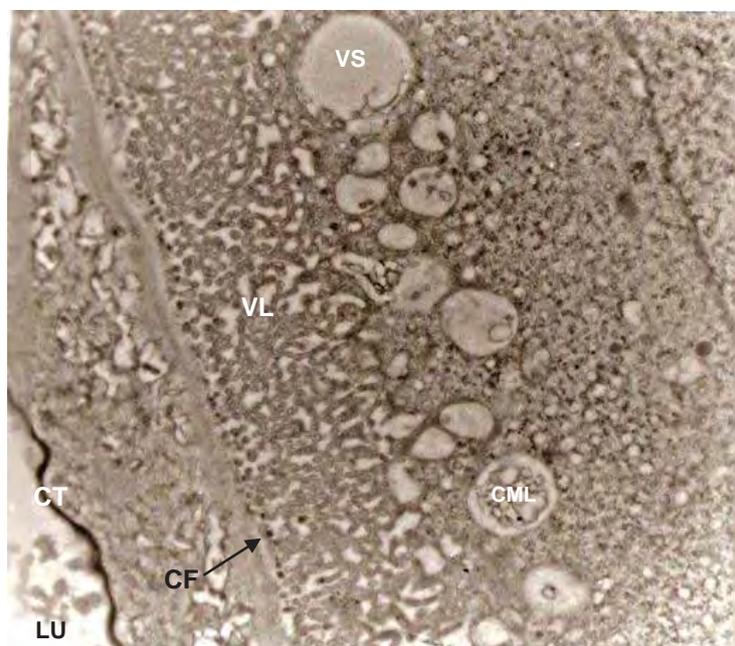


Figura 42. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *P. villosa*. Vista apical e mediana. CML: corpo multilamelar; CF: contato focal; CT: cutícula; LU: lúmen; NC: núcleo; VL: vilosidades; VS: vesícula (Aumento 2900x).

O citoplasma das células apresentou estruturas que não foram encontradas nas outras espécies, como exemplo: corpos multilamelados, lisossomos e autofagossomos (Figura 42 e 43). Além disso, também foram encontradas mitocôndrias de diferentes formas e ribossomos livres, além de uma grande quantidade de vesículas e grânulos, ambos com diferentes eletrondensidades.



Figura 43. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *P. villosa*. Detalhe de diferentes estruturas do citoplasma. **CML** - corpo multilamelado; **LS** – lisossomo; **REL** – retículo endoplasmático liso; **VL** – vilosidades (Aumento 5400x).

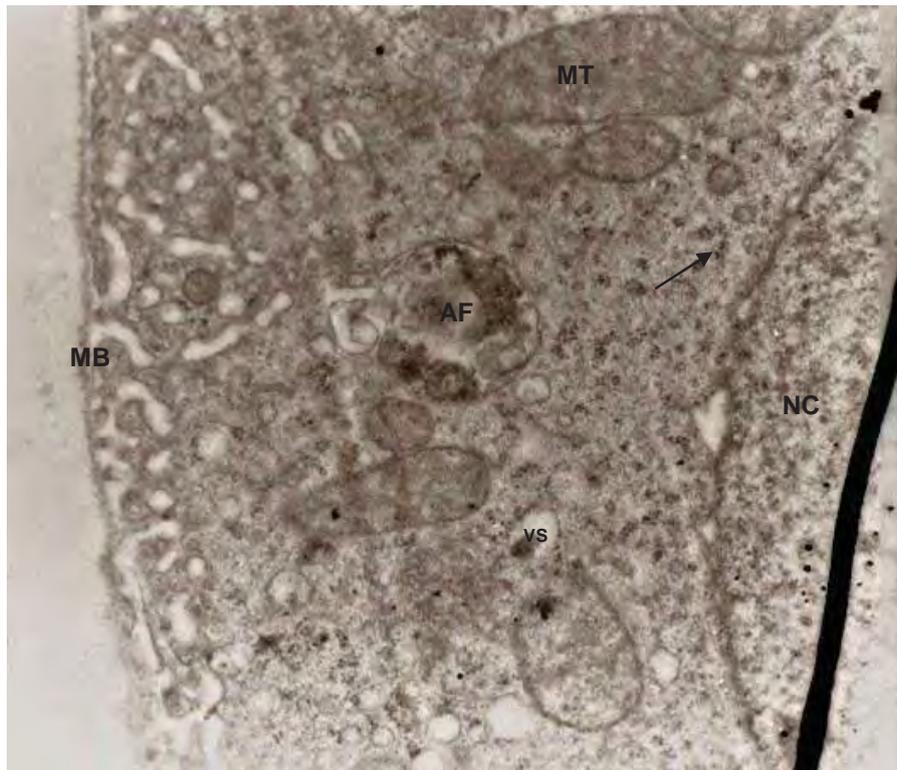


Figura 44. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *P. villosa*. Detalhe da região basal. AF – autofagosomo; MB – membrana basal; MT – mitocôndria; NC - núcleo; vs – vesícula; **seta** - ribossomos (Aumento 5400x).

O retículo endoplasmático granuloso (REG) estava presente em baixa quantidade, enquanto o retículo endoplasmático liso (REL) era abundante. O REG foi encontrado geralmente próximo ao núcleo e sob a forma de pequenos túbulos longitudinais com alguns ribossomos aderidos às suas membranas (Figura 44). Por outro lado, o REL foi encontrado em diferentes regiões do citoplasma formando uma rede tubular bastante característica (Figura 43, 48 e 49).

Os ribossomos eram abundantes em apenas algumas regiões do epitélio, estando sob a forma de rosetas (ribossomos livres), justapostos ao REG, ou formando poliribossomos (Figura 43).

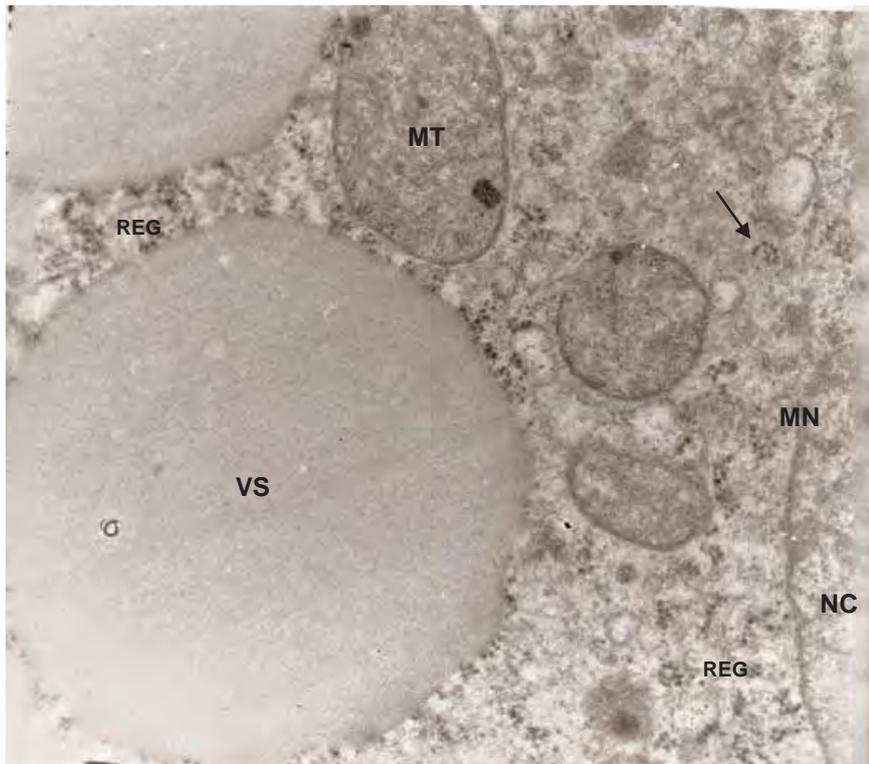


Figura 45. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *P. villosa*. Detalhe da região mediana. MN – membrana nuclear; MT – mitocôndria; NC – núcleo; REG – retículo endoplasmático granuloso; VS – vesícula; seta – ribossomo em forma de roseta (Aumento 8200x).

A análise utilizando o microscópio eletrônico de transmissão revelou uma diferença marcante na ultraestrutura das GPF de *P. villosa* em relação as outras duas espécies analisadas. Em *A. laevigata* e *C. vittatus*, o epitélio é constituído por células semelhantes entre si, ao passo que em *P. villosa* foi observado a existência de dois tipos de células distintas.

Os dois tipos de células podem ser diferenciados observando sua eletrondensidade, mais clara ou escura (Figura 46 e 47). É possível perceber que a célula-A é rica em peroxissomos, corpos multilamelados e autofagossomos,

além de conter um número reduzido de mitocôndrias e vesículas. Por outro lado, a célula-B é rica em mitocôndrias e vesículas de diferentes tamanhos, sendo que essas vesículas também apresentam eletrondensidades diferentes; sugerindo que seu conteúdo também é distinto. Nota-se que a célula-B apresenta um número reduzido de peroxissomos e autofagossomos, sendo que não foram encontrados corpos multilamelares.

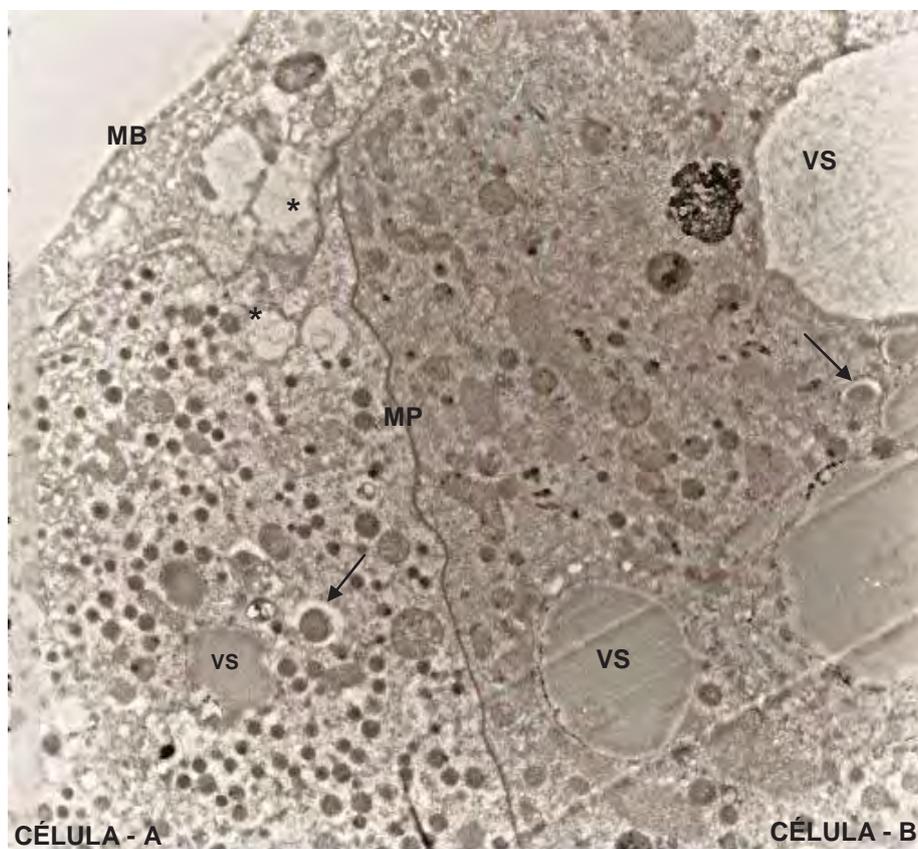


Figura 46. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *P. villosa*. Vista geral. MB – membrana basal; MP – membrana plasmática; vs – vesículas; **asteriscos** – corpo multilamelar **setas** - autofagossomos (Aumento 2900x).

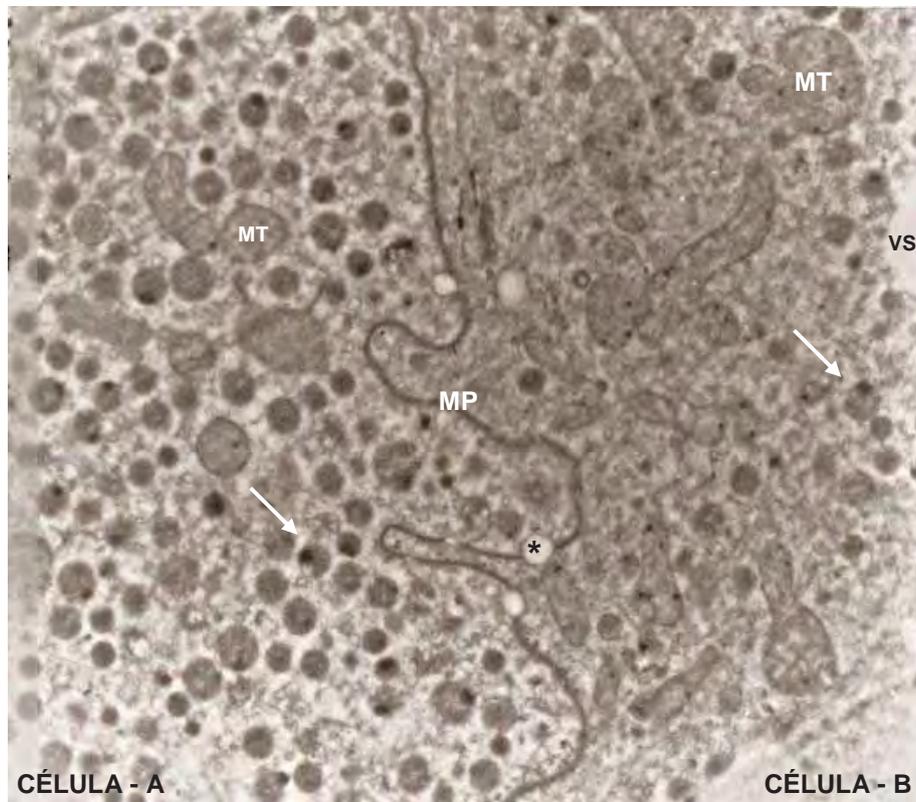


Figura 47. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *P. villosa*. Detalhe dos diferentes tipos celulares. **MP** – membrana plasmática, **MT** – mitocôndrias; **vs** – vesícula; **asterisco** – espaço intercelular; **setas** - peroxissomos (Aumento 1450x).

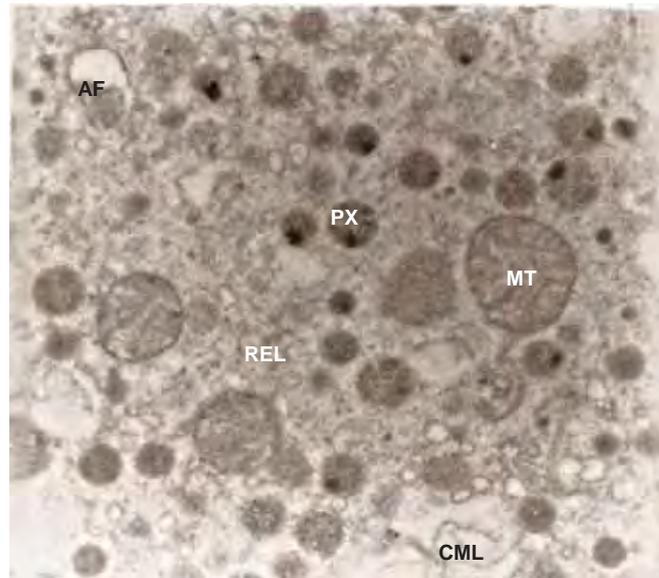


Figura 48. Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *P. villosa*. Detalhe da região mediana da célula-A. AF – autofagossomo; CML – corpo multilamelar; MT – mitocôndria; PX – peroxissomo (Aumento 5400x).

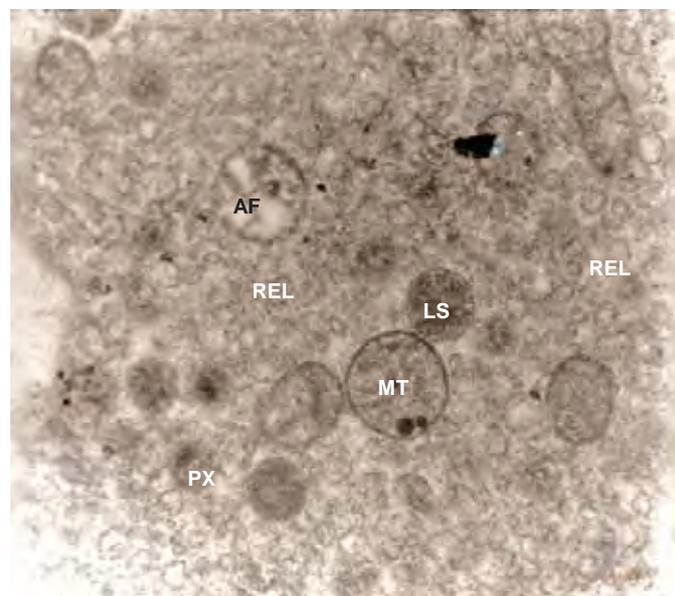


Figura 49 Fotomicrografia ao MET do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *P. villosa*. Detalhe da região mediana da célula-B. AF – autofagossomo; LS – lisossomo; MT – mitocôndria; PX – peroxissomo; REL – retículo endoplasmático liso (Aumento 8200x).

7.2. Bioensaios

Para facilitar o entendimento dos resultados que serão apresentados a seguir será utilizado o termo “pellets” para indicar as partículas sólidas encontradas na cavidade infrabucal das operárias.

Com exceção das GPF, foi encontrado Rodamina em todas as estruturas analisadas do sistema digestório das três espécies estudadas. Como exemplo, na Figura 50 está destacado o sistema digestório de *P. villosa* contendo diferentes quantidades de alimento no papo, no ventrículo, no íleo e no reto. Além disso, em nenhum momento as operárias regurgitaram a solução de água e mel ingerida.

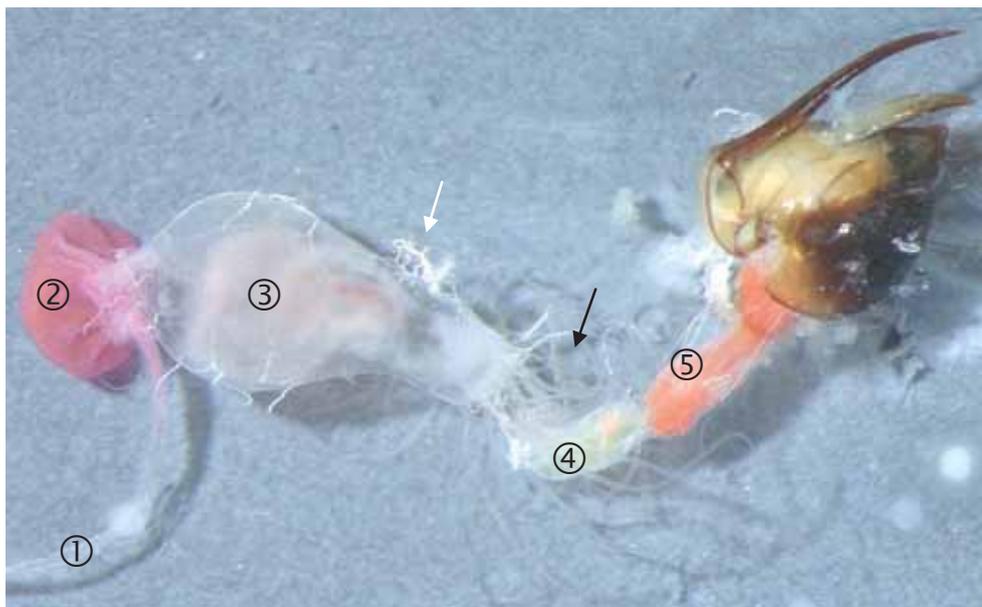


Figura 50. Micrografia do sistema digestório de uma operária de *Pachycondyla villosa* destacando o esôfago ①, o papo ②, o ventrículo ③, o íleo ④ e o reto ⑤ corados pela Rodamina. Seta escura - túbulos de Malpighi, seta clara - sacos aéreos (Aumento 35x).

Foram encontrados traços dos marcadores, tanto do Sudan Black quanto da Rodamina, no interior da cavidade infrabucal das operárias em pelo menos um dos tempos considerados, sendo que sempre que foi registrada a presença dos corantes, eles estavam associados aos pellets retidos nessa estrutura. Também foi observado que em nenhum momento as operárias eliminaram pellets durante o período do experimento.

7.2.1. Corantes vitais – solução de água e mel + Rodamina

Os resultados obtidos na análise da ingestão da solução de água e mel (1:1) contendo Rodamina pelas operárias de *A. laevigata*, *C. vittatus* e *P. villosa* estão resumidos na Tabela 1, 2 e 3, respectivamente. Estão representados a média e o desvio padrão dos valores estimados para a quantidade de alimento encontrado na cavidade infrabucal (CIB), glândulas pós-faríngeas (GPF), papo, ventrículo (VENT) e reto. É possível observar que a Rodamina foi encontrada em todas as estruturas analisadas do sistema digestório, com exceção das GPF.

Atta laevigata

A CIB e o papo foram as primeiras estruturas coradas, e somente após 2 e 12 horas da ingestão do alimento a Rodamina foi encontrada no ventrículo e no reto das operárias, respectivamente. O papo foi a estrutura que apresentou a maior quantidade de corante ao longo de 72 horas, sendo que não foram observadas grandes mudanças na quantidade de alimento presente nesse local (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de alimento presente em diferentes órgãos do sistema digestório de *Atta laevigata* (Corante: Rodamina)(n=70).

Tempo	CIB	GPF	PAPO	VENT.	RETO
10 min.	$0,8 \pm 0,5$	0	$2,1 \pm 0,7$	0	0
1h.	$1,0 \pm 0,8$	0	$2,0 \pm 1,1$	0	0
2h.	$1,0 \pm 0,4$	0	$2,1 \pm 0,7$	$0,8 \pm 0,5$	0
8h.	$0,9 \pm 1,0$	0	$2,0 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,5$	0
12h.	$1,0 \pm 1,1$	0	$2,5 \pm 1,4$	$0,5 \pm 0,7$	$0,4 \pm 0,2$
24h.	$1,1 \pm 0,5$	0	$1,8 \pm 1,1$	$0,7 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,2$
72h.	$0,7 \pm 0,4$	0	$2,5 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,3$

Uma pequena parte da solução de água e mel armazenada no papo foi transferida para o ventrículo após 2 horas, e somente após 12 no reto. A partir deste momento a quantidade de alimento no intestino posterior permaneceu praticamente constante.

Camponotus vittatus

A CIB e o papo foram as primeiras estruturas a serem coradas, ao passo que o ventrículo e o reto apresentaram traços do marcador somente após 8 e 12 horas da ingestão do alimento, respectivamente.

Em *C. vittatus*, o papo também foi a estrutura que apresentou a maior quantidade de alimento, praticamente toda a solução de água e mel ingerida foi

armazenada neste local. Contudo, diferente de *A. laevigata*, parte do alimento armazenado no papo foi transferido para o ventrículo somente após 8 horas. Nesta espécie foi encontrado Rodamina no reto das operárias somente após 12 e 72 horas da ingestão da dieta (Tabela 2).

Tabela 2. Quantidade de alimento presente em diferentes estruturas do sistema digestório de *Camponotus vittatus* (Corante: Rodamina)(n=70).

Tempo	CIB	GPF	PAPO	VENT.	RETO
10 min.	$0,8 \pm 0,5$	0	$2,5 \pm 0,7$	0	0
1h.	$0,4 \pm 0,2$	0	$2,9 \pm 0,8$	0	0
2h.	0	0	$3,0 \pm 0,0$	0	0
8h.	$0,8 \pm 0,5$	0	$3,0 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,5$	0
12h.	$1,0 \pm 0,8$	0	$2,9 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,3$
24h.	$1,7 \pm 1,3$	0	$2,8 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,4$
72h.	0	0	$3,0 \pm 0,0$	$0,5 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,3$

Pachycondyla villosa

A CIB e o papo foram as primeiras estruturas coradas, e somente após 12 e 72 horas foi encontrado Rodamina no ventrículo e no reto das operárias, respectivamente. Diferentes das demais espécies a quantidade de alimento encontrado na CIB foi constante em todos os tempos analisados.

Tabela 3. Quantidade de alimento presente em diferentes estruturas do sistema digestório de *Pachycondyla villosa* (Corante: Rodamina)(n=18).

Tempo	CIB	GPF	PAPO	VENT.	RETO
10 min.	1,0 ± 0,0	0	3,0 ± 0,0	0	0
45 min.	1,0 ± 0,0	0	3,0 ± 0,0	0	0
2h.	1,0 ± 0,0	0	3,0 ± 0,0	0	0
12h.	1,0 ± 0,0	0	2,6 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0
24h.	1,0 ± 0,0	0	2,6 ± 0,5	0,6 ± 0,5	0
72h.	1,0 ± 0,0	0	2,6 ± 0,5	0,6 ± 0,5	0,6 ± 0,5

O papo foi a estrutura que apresentou a maior quantidade de alimento de todas as estruturas analisadas do sistema digestório de *P. villosa*, sendo que somente a partir de 12 horas ocorreu uma pequena mudança na quantidade de alimento presente neste local (Tabela 3).

A variação na quantidade de Rodamina presente no papo ocorreu devido ao deslocamento de parte da dieta para o intestino médio. Além disso, *P. villosa* foi a espécie em que a dieta levou mais tempo para ser encontrada no reto (Tabela 3). Apesar da solução de água e mel ter levado mais tempo para atingir o reto, deve ser levado em consideração que foi utilizado um número menor de indivíduos em comparação com as demais espécies estudadas. Fator que pode influenciar nas observações

7.2.2. Corantes vitais – óleo de soja + Sudan Black

Os resultados dos bioensaios da ingestão do óleo de soja contendo Sudan Black pelas operárias de *A. laevigata*, *C. vittatus* e *P. villosa* estão resumidos na Tabela 4, 5 e 6, respectivamente. Estão representados a média e o desvio padrão dos valores estimados para a quantidade de alimento encontrado na cavidade infrabucal (CIB), glândulas pós-faríngeas (GPF), papo, ventrículo (VENT) e reto.

Atta laevigata

Todas as estruturas analisadas do sistema digestório de *A. laevigata* apresentaram traços de Sudan Black em pelo menos algum dos tempos. Imediatamente após a ingestão do alimento as GPF e o papo já apresentaram Sudan Black em seu interior, e somente após 8 horas foi encontrado alimento no ventrículo e reto das operárias.

A estrutura que apresentou a maior quantidade de alimento foi as GPF, ao passo que apenas uma pequena parte da dieta foi encontrada no papo. Um fato marcante observado neste bioensaio foi a presença de uma pequena quantidade de Sudan Black no ventrículo e no reto das operárias após oito horas da ingestão dieta, sugerindo que parte do óleo de soja pode ter se deslocado para o intestino posterior.

Tabela 4. Quantidade de alimento presente em diferentes órgãos do sistema digestório de *Atta laevigata* (Corante: Sudan Black)(n=70).

Tempo	CIB	GPF	PAPO	VENT.	RETO
10 min.	0	2,6 ± 0,5	0,3 ± 0,4	0	0
1h.	0	2,7 ± 0,4	0,3 ± 0,5	0	0
2h.	1,3 ± 1,3	2,6 ± 0,5	0,4 ± 0,7	0	0
8h.	0	2,8 ± 0,4	0,6 ± 0,8	0,2 ± 0,4	0,3 ± 0,5
12h.	1,3 ± 1,3	2,5 ± 0,5	0,6 ± 0,8	0,4 ± 0,5	0,3 ± 0,5
24h.	0	2,8 ± 0,4	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,4	0,3 ± 0,5
72h.	0	2,5 ± 0,6	0,2 ± 0,5	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,4

Camponotus vittatus

Foi encontrado Sudan Black apenas na CIB, nas GPF e no papo das operárias. Imediatamente após a ingestão do alimento a CIB, as GPF e o papo já apresentavam alimento em seu interior.

Em todos os tempos analisados a estrutura que apresentou a maior quantidade de óleo de soja foi as GPF. Entretanto, também foi encontrado óleo de soja no papo das operárias de *C. vittatus*, uma quantidade maior até que a encontrada no papo de *A. laevigata*, contudo, o Sudan Black não foi encontrado no ventrículo e nem no reto.

Tabela 5. Quantidade de alimento presente em diferentes órgãos do sistema digestório de *Camponotus vittatus* (Corante: Sudan Black)(n=70).

Tempo	CIB	GPF	PAPO	VENT.	RETO
10 min.	0,4 ± 1,0	2,4 ± 0,6	1,2 ± 0,6	0	0
1h.	0	2,5 ± 0,4	1,7 ± 0,9	0	0
2h.	0	2,6 ± 0,3	2,1 ± 0,7	0	0
8h.	1,7 ± 1,3	2,8 ± 0,4	0,6 ± 0,8	0	0
12h.	0	2,9 ± 0,3	0,3 ± 0,5	0	0
24h.	1,0 ± 1,1	2,1 ± 0,9	1,8 ± 1,1	0	0
72h.	0	2,8 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0	0

Pachycondyla villosa

Foi encontrado Sudan Black na CIB, nas GPF e no papo das operárias. Imediatamente após a ingestão do alimento a CIB, as GPF e o papo já apresentavam alimento em seu interior.

Diferente das demais espécies estudadas, todas as operárias de *P. villosa* continham "pellets" marcados pelo Sudan Black no interior da CIB.

Em todos os tempos analisados as estruturas que apresentaram a maior quantidade de óleo de soja foram as GPF. Em comparação com *A. laevigata* e *C. vittatus* as GPF de *P. villosa* apresentaram uma maior quantidade de óleo de soja em seu interior.

Por outro lado, semelhante ao encontrado para *A. laevigata*, o papo de *P. villosa* apresentou apenas uma pequena quantidade de óleo de soja em seu

interior. Sugerindo que o óleo de soja entra diretamente nas GPF, até que seu lúmen esteja repleto de alimento, momento em que o restante é direcionado para o papo. Semelhante ao observado para *C. vittatus*, não foi encontrado óleo de soja no ventrículo e nem no reto das operárias de *P. villosa*.

Tabela 6. Quantidade de alimento presente em diferentes órgãos do sistema digestório de *Pachycondyla villosa* (Corante: Sudan Black)(n=18).

Tempo	CIB	GPF	PAPO	VENT.	RETO
10 min.	1,0 ± 0,0	2,6 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0	0
45 min.	1,0 ± 0,0	2,6 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0	0
2h.	0,3 ± 0,5	3,0 ± 0,0	0	0	0
12h.	1,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	0	0	0
24h.	0,3 ± 0,5	3,0 ± 0,0	0,6 ± 0,5	0	0
72h.	1,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	0,3 ± 0,5	0	0

7.2.3. Autoradiografia para microscopia de luz

Diferentes lâminas histológicas contendo cortes semifinos das GPF de *A. laevigata*, *C. vittatus* e *P. villosa* foram reveladas após três, sete e dez dias de exposição ao material radioativo. A análise das lâminas ao microscópio de luz revelou que após sete dias os cortes apresentaram um número adequado de grãos de prata. Desta forma, o material que foi analisado ao microscópio eletrônico de transmissão permaneceu em caixas com ausência total de luz durante 70 dias. Após este período as telinhas foram reveladas, analisadas e fotografadas.

7.3. Autorradiografia para microscopia eletrônica de transmissão

Considerando que o objetivo foi realizar uma análise qualitativa do fluxo do ácido oléico no interior das glândulas pós-faríngeas não foi necessário determinar os eventuais desvios sofridos pelas partículas β^- emitidas pelo trítio.

Atta laevigata

A análise das operárias que receberam o óleo de soja contendo ácido oléico tritiado revelou que o lúmen das GPF é preenchido rapidamente após a ingestão do alimento (Figura 51). As regiões de maior eletrondensidade observadas nesta figura são o resultado da precipitação dos sais de prata que foram ionizados pela radiação emitida pelo trítio.

Após dez minutos da ingestão da dieta, foi observado inúmeras marcações distribuídas por grande parte das digitações, muitas delas próximas à região apical do epitélio (Figura 51 e 52). Algumas dessas marcações indicam que o ácido oléico presente no lúmen estava em contato direto com a cutícula que reveste a região apical das GPF. Entretanto, não foram encontradas marcações além da cutícula, sugerindo que o ácido oléico ainda não havia sido incorporado pelo epitélio.

A Figura 53 mostra que o processo de absorção do ácido oléico ocorreu a partir de uma hora após a ingestão da dieta. Foram encontradas marcações apenas no lúmen e na cutícula que reveste o epitélio, indicando que o ácido oléico penetra nas células por difusão.

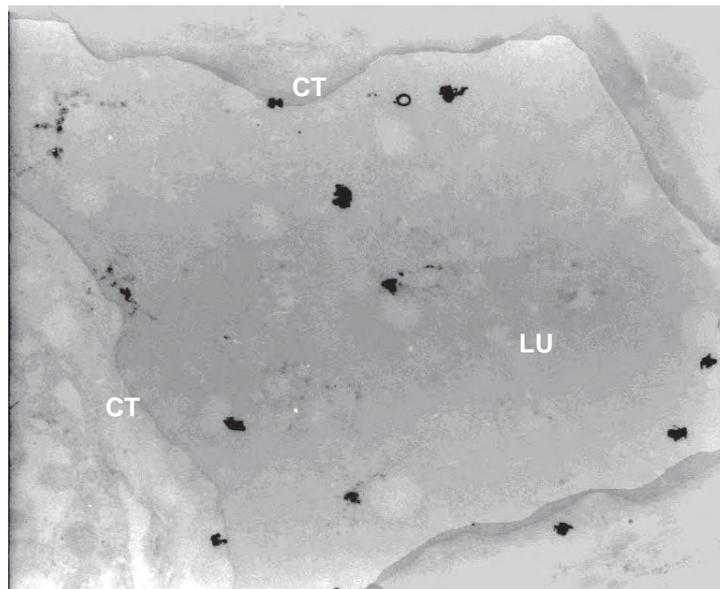


Figura 51. Fotomicrografia ao MET das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata* após 10 minutos da ingestão do ácido oléico tritiado. Detalhe das marcações distribuídas por todo lúmen (LU) e próximas da cutícula (CT) (Aumento 2900x).

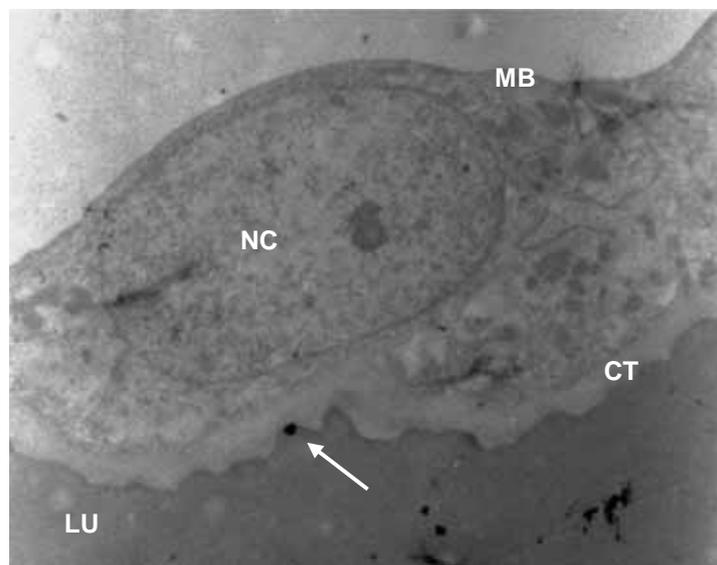


Figura 52. Fotomicrografia ao MET das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata* após 10 minutos da ingestão do ácido oléico tritiado. Vista geral do epitélio mostrando algumas marcações no lúmen (LU) e próximas à cutícula (CT). **seta:** marcação; **NU:** núcleo; **MB:** membrana basal (Aumento 1150x).

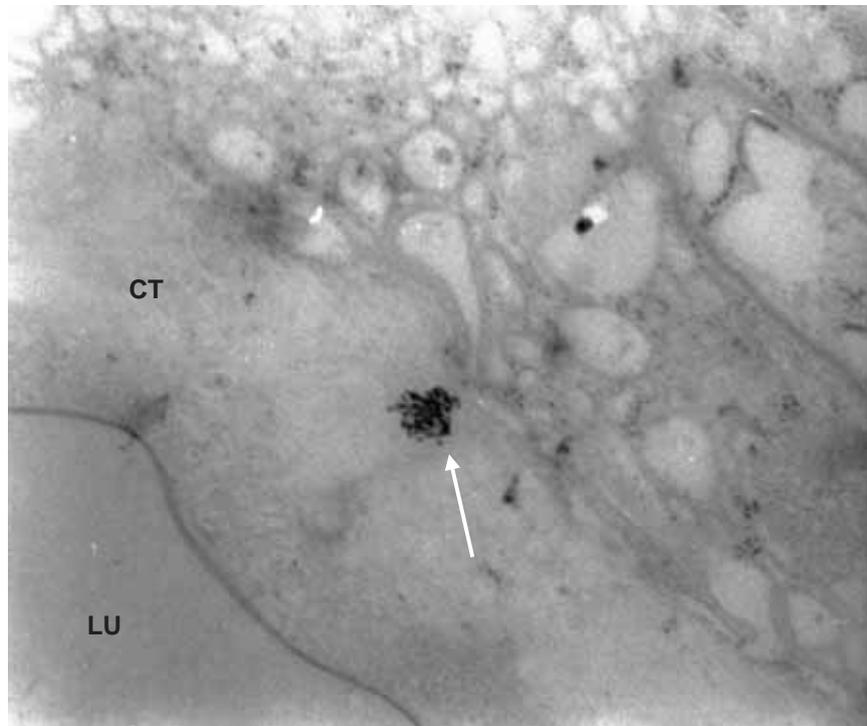


Figura 53. Fotomicrografia ao MET das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata* após 1 hora da ingestão do ácido oléico tritiado. Detalhe de uma marcação (*seta*) sobre a cutícula (**CU**) e próxima da região apical do epitélio. **LU**: lúmen (Aumento 8200x).

Decorridas duas horas, a maior parte das marcações observadas ainda estavam localizadas no lúmen e sobre a cutícula, entretanto, também foram encontradas algumas marcações no interior do epitélio (Figura 54). Após oito horas, foi registrado um número maior de vesículas, as quais passaram a ocupar grande parte do citoplasma das células (Figura 55). Estas vesículas eram de tamanho médio quando comparadas às vesículas que foram observadas nos tempos 24 e 72 horas (Figura 58, 60 e 62).

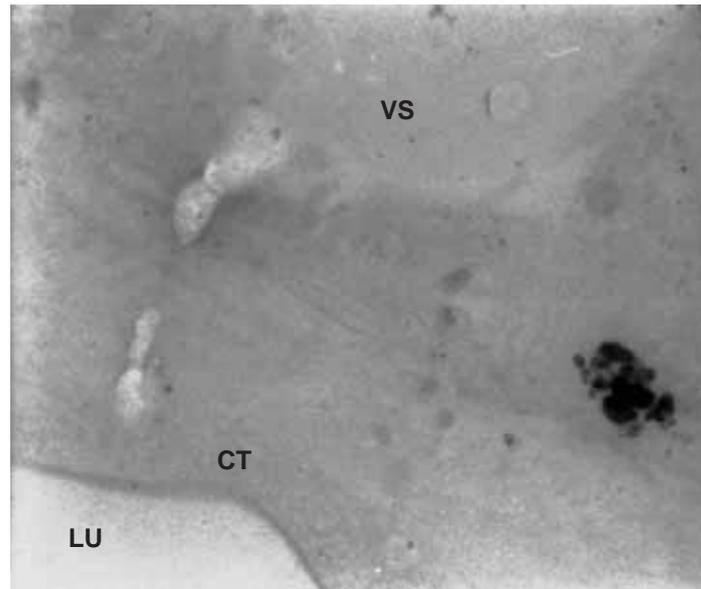


Figura 54. Fotomicrografia ao MET das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata* após 2 horas da ingestão do ácido oléico tritiado. Detalhe de uma marcação no interior do epitélio. LU: lúmen; CT: cutícula; vs: vesícula (Aumento 13500x).

A presença das marcações continuou a ser observada após 8, 12, 24 e 72 horas da ingestão da dieta, sendo que ao longo destes períodos as principais modificações ocorridas foram:

- continuação da entrada do ácido oléico do lúmen das GPF para o interior do epitélio.
- maior quantidade de vesículas contendo marcações por todo o citoplasma das células (Figura 56).
- deslocamento das vesículas presentes na região apical em direção à região basal do epitélio (Figura 56 e 57).
- deslocamento e compactação das organelas, e deformação do núcleo das células devido ao acúmulo de alimento no citoplasma (Figura 58 e 59).
- formação de vesículas contendo uma grande quantidade de alimento (Figura 60).
- expansão do epitélio das GPF (Figura 61).

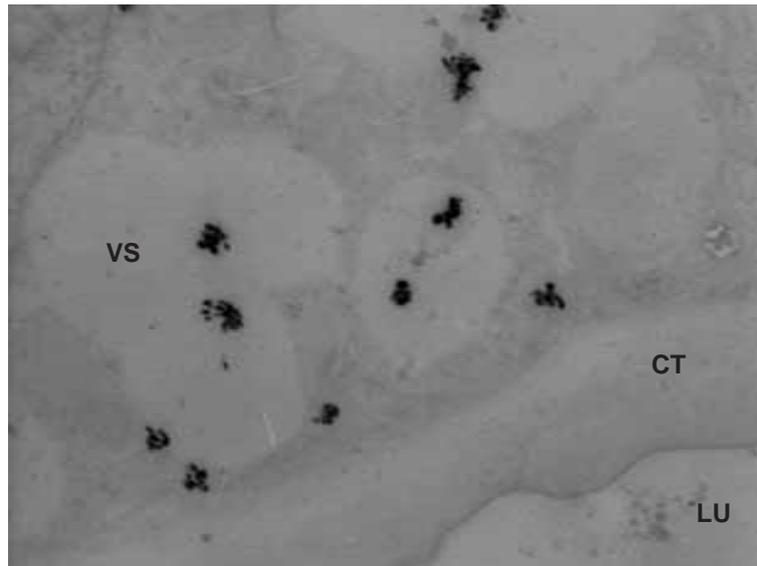


Figura 55. Fotomicrografia ao MET das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata* após 8 horas da ingestão do ácido oléico tritiado. Detalhe da região apical mostrando diversas vesículas contendo marcações. LU: lúmen; CT: cutícula; vs: vesícula (Aumento 4200x).

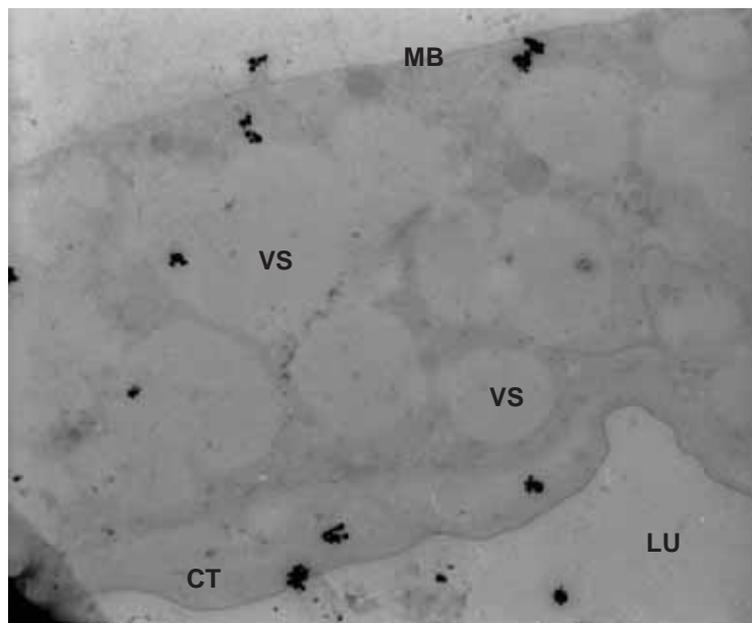


Figura 56. Fotomicrografia ao MET das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata* após 12 horas da ingestão do ácido oléico tritiado. Vista geral do epitélio mostrando diversas vesículas contendo marcações. LU: lúmen; CT: cutícula; vs: vesícula; MB: membrana basal (Aumento 2900x).

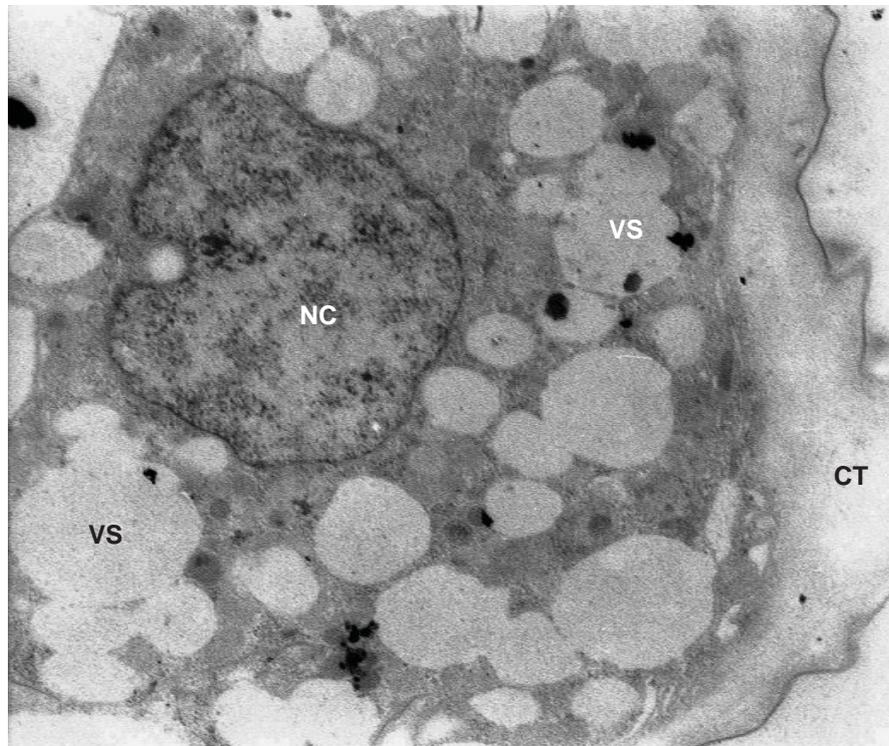


Figura 57. Fotomicrografia ao MET das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata* após 24 horas da ingestão do ácido oléico tritiado. Vista geral do epitélio mostrando vesículas tanto na região apical quanto na região basal. **NU:** núcleo; **CT:** cutícula; **VS:** vesícula; **LM:** lâmina basal (Aumento 2050x).

Na Figura 61 pode ser observado um grande número vesículas distribuídas por todo o epitélio. Em alguns casos é possível perceber que existe mais de uma marcação em uma mesma vesícula, fato decorrente da união de diferentes gotas de ácido oléico. O acúmulo de lipídeos no epitélio é inicia-se após oito horas (Figura 55) e pode ser visivelmente notado após 12 horas da ingestão do alimento (Figura 56 e 61).

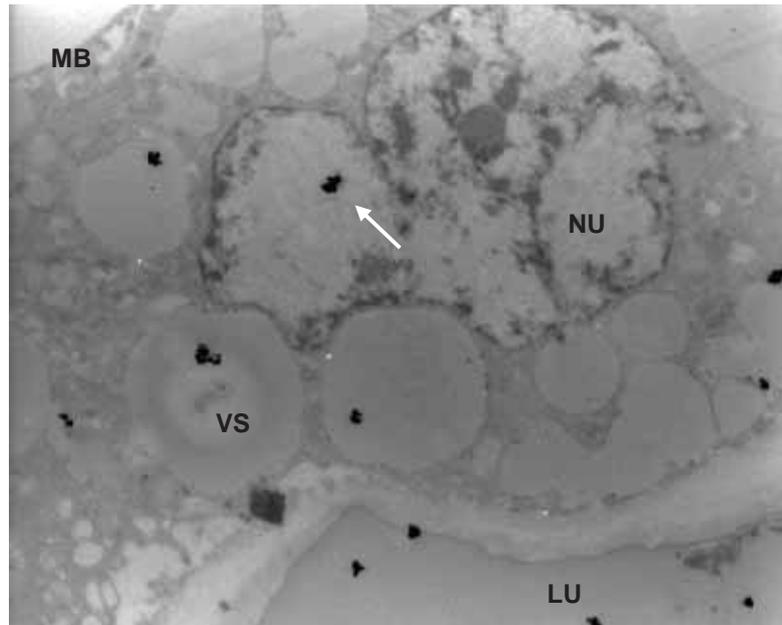


Figura 58. Fotomicrografia ao MET das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata* após 24 horas da ingestão do ácido oléico tritiado. Vista geral do epitélio mostrando o núcleo da célula deformado. **NU:** núcleo; **vs:** vesícula; **MB:** membrana basal; **seta:** marcação no núcleo (Aumento 2050x).

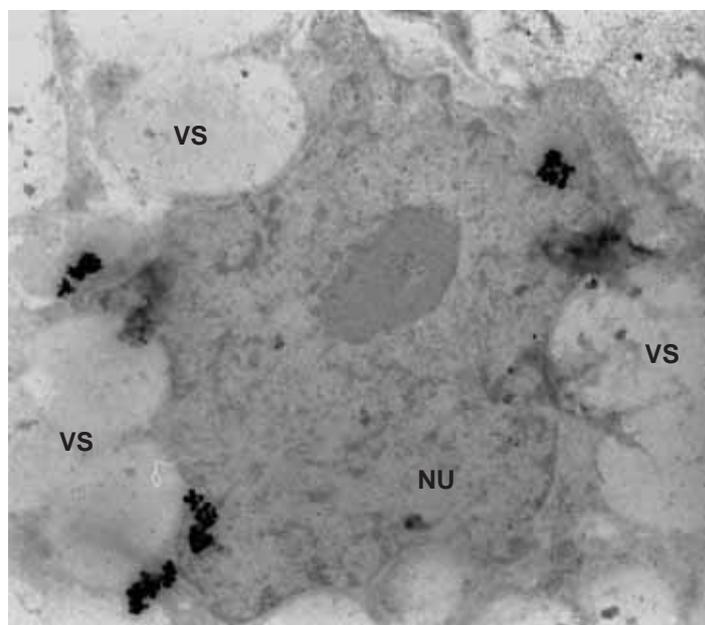


Figura 59. Fotomicrografia ao MET das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata* após 72 horas da ingestão do ácido oléico tritiado. Detalhe do núcleo deformado pelo acúmulo de alimento no citoplasma. **NU:** núcleo; **vs:** vesícula (Aumento 4200x).

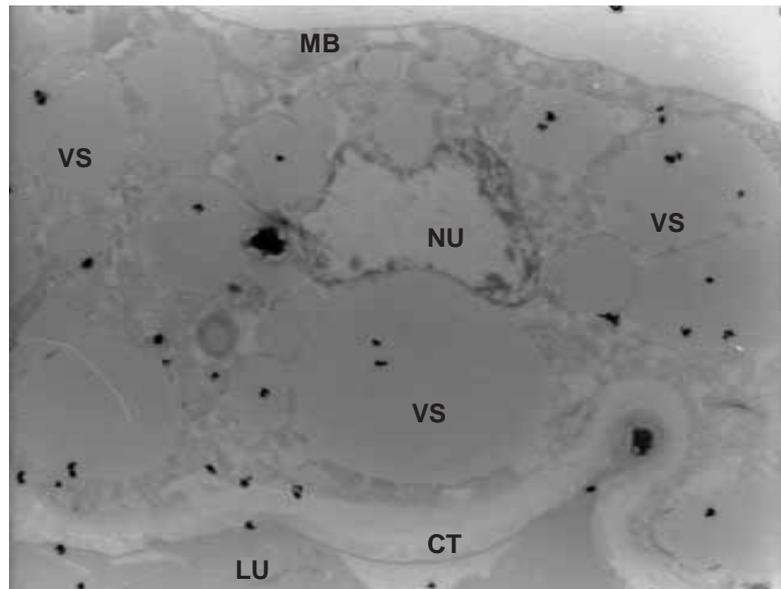


Figura 60. Fotomicrografia ao MET das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata* após 72 horas da ingestão do ácido oléico tritado. Vista geral do epitélio contendo muitas vesículas espalhadas pelo citoplasma. NU: núcleo; CT: cutícula; VS: vesícula; LU: lúmen; MB: membrana basal (Aumento 1450x).

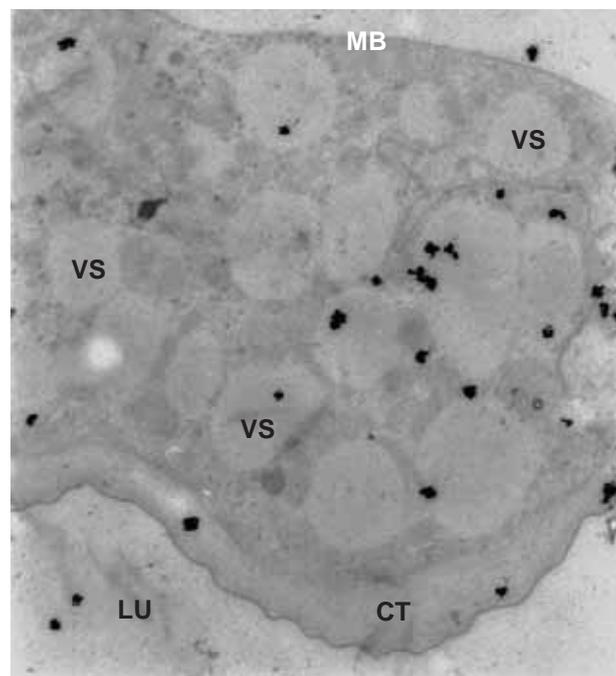


Figura 61. Fotomicrografia ao MET das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata* após 12 horas da ingestão do ácido oléico tritado. Vista geral mostrando o epitélio expandido devido ao acúmulo de ácido oléico. CT: cutícula; VS: vesícula; MB: membrana basal; LU: lúmen (Aumento 2050x).

Um fato que deve ser ressaltado é a situação encontrada após 72 horas, em que inúmeras vezes foi observado uma única vesícula de ácido oléico ocupando praticamente todo o citoplasma da célula (Figura 62 e 11). Assim, devido ao acúmulo de alimento, o núcleo das células frequentemente estava deformado, as organelas compactadas em determinadas regiões do citoplasma e o epitélio expandido (Figura 58, 59, 60, 62 e 63). Além disso, apesar de ter sido observado a presença de organelas especializadas no metabolismo de lipídeos, como os peroxissomos, não foi registrado nenhum indício destas organelas atuando diretamente sobre as vesículas contendo o ácido oléico. Entretanto, deve ser considerado que, em alguns casos, foi observado gotas de lipídeos envolvidas por membranas, mas sem a marcação do trítio. Assim, pode-se dizer que, aparentemente, o ácido oléico ingerido pelas operárias de *A. laevigata* não sofreu nenhum tipo de modificação durante o tempo que permaneceram no interior do epitélio das GPF.

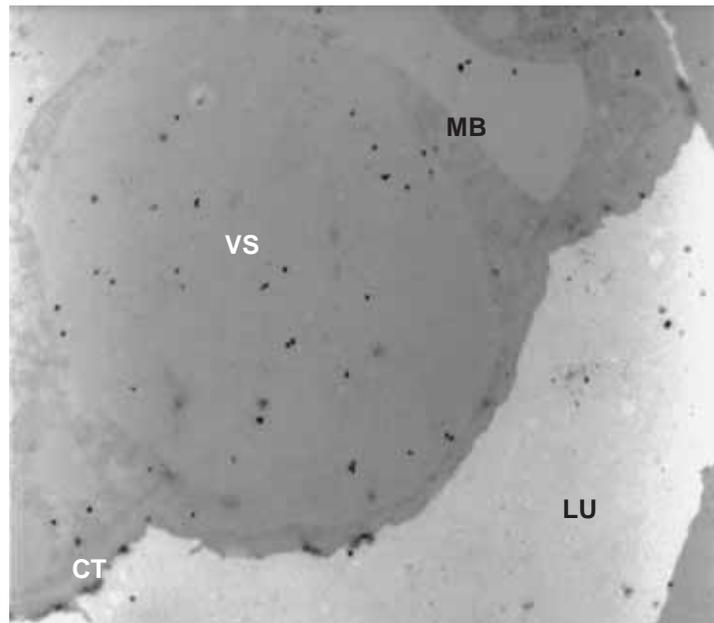


Figura 62. Fotomicrografia ao MET das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata* após 72 horas da ingestão do ácido oléico tritiado. Vista geral mostrando uma vesícula contendo ácido oléico ocupando toda a célula. CT: cutícula; vs: vesícula; MB: membrana basal; LU: lúmen (Aumento 810x).

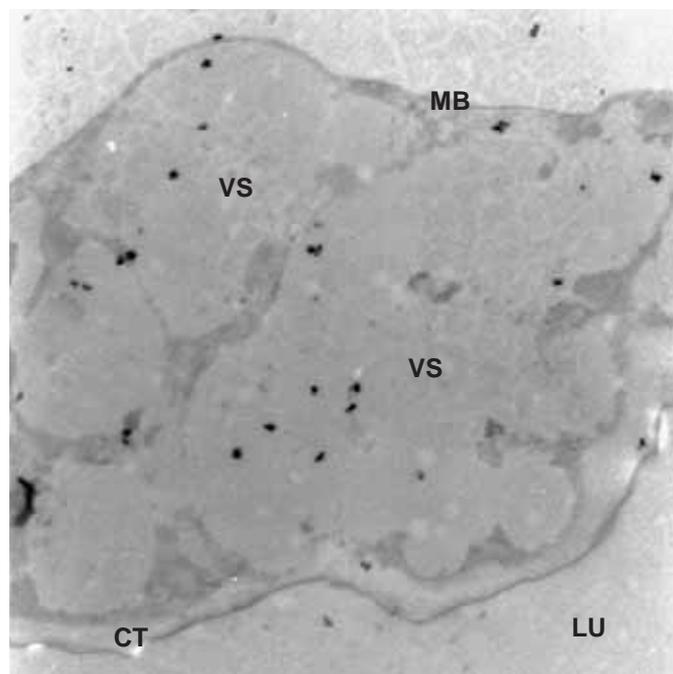


Figura 63. Fotomicrografia ao MET das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata* após 72 horas da ingestão do ácido oléico tritiado. Vista geral mostrando o epitélio expandido e com inúmeras vesículas. CT: cutícula; vs: vesícula; MB: membrana basal; LU: lúmen (Aumento 1450x).

A partir de 12 horas, foram encontradas muitas marcações próximas à região basal das células, porém, algumas delas encontravam-se fora do epitélio das GPF. As marcações encontradas fora do epitélio estavam bem próximas da região basal ou distantes dela, sugerindo que uma pequena parte do ácido oléico atravessa o epitélio das GPF e cai diretamente na hemolinfa das operárias (Figura 56, 60, 61, 62 e 63).

Outro fato que deve ser destacado é a presença de marcações no interior do núcleo das células, sugerindo a presença de ácido oléico em seu interior (Figura 58 e 59). É provável que estas marcações tenham sido formadas devido ao desvio sofrido por algumas partículas emitidas pelo trítio e, conseqüentemente, a sua localização real não é o interior do núcleo. Entretanto, isto deve ser analisado com cautela, já que algumas destas marcações estavam numa região central do núcleo, sugerindo que elas não foram “arrastadas”, mas sim, realmente formadas naquele local (Figura 64).

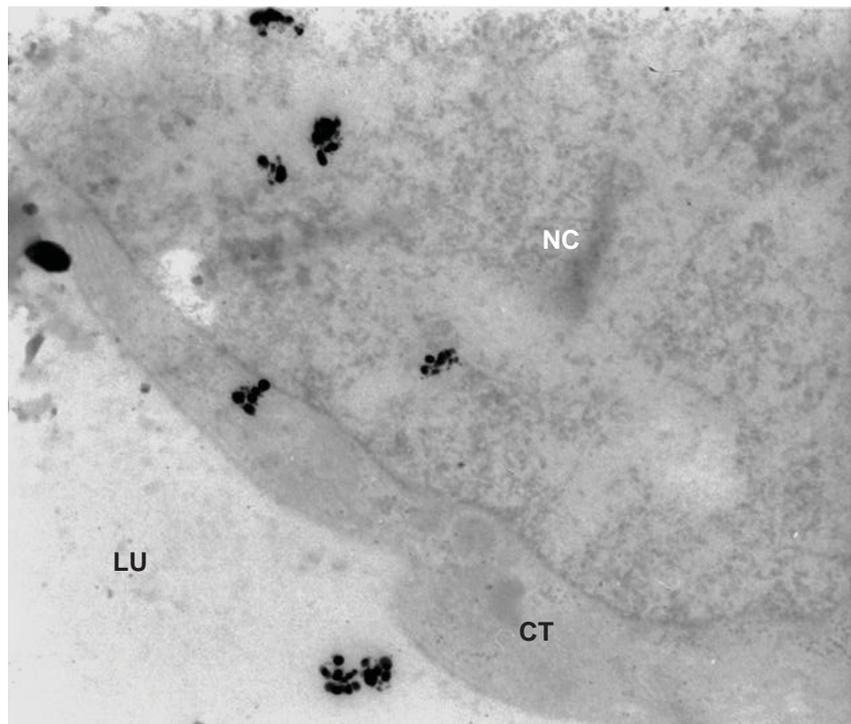


Figura 64. Fotomicrografia ao MET das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata* após 12 horas da ingestão do ácido oléico tritiado. Detalhe do núcleo contendo marcações em seu interior. LU: lúmen; CT: cutícula; NC: núcleo (Aumento 5400x).

8. Discussão

No presente trabalho procurou-se descrever alguns dos processos envolvidos na utilização de alimentos pelas operárias de três espécies de formigas com padrões alimentares distintos. Além da análise do fluxo desses alimentos ao longo do sistema digestório dos indivíduos, foram realizadas análises descritivas e comparativas da principal estrutura envolvida no processamento dos lipídeos ingeridos; as glândulas pós-faríngeas.

A descrição das GPF de *A. laevigata*, *C. vittatus* e *P. villosa* aqui realizadas é semelhante à encontrada para outras espécies do mesmo gênero, como por exemplo, das glândulas de *A. sexdens rubropilosa* (BUENO 2005), *C. rufipes* (GAMA; CRUZ-LANDIM 1982; GAMA 1985), e *Pachycondyla striata* (Smith) (GAMA; CRUZ-LANDIM 1982), respectivamente. Entretanto, no presente estudo, os conhecimentos da morfologia e funções dessa estrutura foram ampliados e outras particularidades adicionadas.

8.1. Ultramorfologia das glândulas pós-faríngeas (GPF)

As GPF têm origem ectodérmica, surgindo durante o desenvolvimento pós-embrionário a partir de duas expansões dorsolaterais do epitélio faríngeal (JANET 1905; GAMA 1985). Apesar de sua constituição ectodérmica, Delage-Darchen (1976) consideram a sua origem distinta das demais glândulas do sistema salivar das formigas, uma vez que elas teriam origem a partir dos metâmeros das peças bucais, enquanto as GPF se diferenciariam de uma porção do estomodeo.

As GPF das operárias de *A. laevigata* são compostas por dois conjuntos de projeções digitiformes, alongadas e de aspecto tubular, que estão inseridas na porção latero-posterior da placa hipofaríngea, justamente entre a musculatura da faringe e esôfago. Sua localização e morfologia são semelhantes à encontrada em *A. sexdens rubropilosa* (BUENO 2005) e *L. humile* (JESUS 2006), e diferente da observada em *P. fulva* (JESUS 2006) e *P. villosa*. Já em *C. rufipes*, as GPF apresentam duas porções saculiformes em sua base, uma de cada lado da glândula, que se ramificam para formar as projeções digitiformes. De maneira geral, a morfologia dessas glândulas segue um padrão dentro do gênero, apresentando poucas diferenças entre as espécies que fazem parte do grupo. Como diferenças, podemos citar que as GPF de *Camponotus arboreus* (Smith) apresentam a porção saculiforme expandida, maior e mais recortada que *Camponotus abdominalis* (Fabricius) (GAMA; CRUZ-LANDIM 1982) e *C. vittatus*.

A morfologia apresentada pelas GPF das operárias de *P. villosa* é diferente de todas as espécies descritas neste trabalho. Elas são constituídas por duas projeções lobuladas, inseridas uma de cada lado na placa hipofaríngea, e que apresentam duas porções distintas: uma superior e mais larga, e outra inferior e curta. Além dessa glândula não apresentar digitações, as células que compõe o epitélio de revestimento externo também são pronunciadamente diferentes. Elas são arredondadas e, podem ou não, apresentar um orifício circular ou fendado em sua região central. Semelhante à *P. villosa*, é o epitélio encontrado nas GPF de *D. australis*, uma espécie que também pertence ao grupo dos Poneromorfos (SCHOETERS; BILLEN 1996); do qual *P. villosa* faz parte. Contudo, nessa espécie as células que revestem a

glândula são achatadas, diferente de *P. villosa*, em que as células são altas e arredondadas. Além disso, a característica mais importante que deve ser discutida e ressaltada em relação à morfologia externa das GPF de *P. villosa*, é a presença de células contendo um orifício, circular ou fendado, distribuídas em vários pontos do epitélio. Até o presente momento isto não havia sido documentado para nenhuma espécie de formiga, e sugere que *P. villosa* possui células que são especializadas em transportar o conteúdo das GPF para a hemolinfa.

Não foi encontrado nenhum tipo de musculatura associada às digitações ou lobos das GPF das espécies analisadas. Alguns trabalhos já realizados também nunca fizeram menção a este tipo de estrutura no epitélio dessas glândulas (PEREGRINE et al. 1973; BUENO 2005). Assim, estes autores discutem a forma com a qual os lipídeos que entram nas GPF seriam posteriormente eliminados. Como exemplo, Peregrine et al. (1973) sugerem que em *A. octospinosus* o material processado no interior dessas glândulas seria eliminado por pressão da hemolinfa, ou então, lançado lentamente no esôfago. No presente estudo, em nenhum momento foi observado a diminuição do conteúdo das GPF, pelo contrário, ocorreu o aumento da quantidade de lipídeos no citoplasma das células, principalmente na região basal. Nesse sentido, considerando apenas as 72 horas analisadas, é pouco provável que o conteúdo das glândulas esteja sendo eliminado de volta ao esôfago das operárias.

Também deve ser mencionado que ao manter as operárias por pouco tempo no freezer, e as GPF fossem removidas rapidamente, era possível observar a contração de toda a glândula, como se ela estivesse sofrendo

espasmos musculares. Esta observação sugere que a musculatura inserida na placa hipofaríngea, e que está associada à faringe e ao esôfago, pode ser capaz de realizar a “contração” das digitações. Contudo, resta saber se essas contrações auxiliam somente a entrada e/ou saída dos lipídeos.

O aumento da quantidade de lipídeos no interior das GPF é outro ponto que deve ser destacado. Em um de seus estudos, Bueno (2005) faz importantes considerações sobre o comportamento de ingestão de lipídeos por operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Nele, é mencionado que esta espécie não encontra grandes quantidades de lipídeos em sua fonte alimentar, bastante específica, e por ventura, quando entram em contato com lipídeos que são tóxicos acabam morrendo. Isto ocorre devido ao fato dessas formigas não terem um limite de ingestão e mecanismos eficientes para eliminar o excesso de lipídeos. No presente trabalho, isto parece ser comum para as três espécies de formigas analisadas. A partir do momento em que os lipídeos foram ingeridos, eles deslocaram-se para as GPF e lá ficam armazenados, sendo que apenas uma pequena parte deles foi absorvida pela hemolinfa. Em outras espécies de formigas, como *L. humile* e *T. melanocephalum* também foi observado que os compostos lipossolúveis ingeridos, principalmente quando misturados a outros elementos (carboidratos e/ou proteínas), são deslocados para as GPF (JESUS 2006). O interessante, então, é notar que se estes lipídeos estiverem em grande quantidade isto pode causar a morte do indivíduo, independente dele ser tóxico ou não.

Em todas as espécies analisadas foram encontradas glândulas hipofaríngeas próximas às GPF, sendo que as principais diferenças entre elas são a forma e sua quantidade de células. Em *A. laevigata* e *P. villosa* as

glândulas hipofaríngeas eram esféricas e formadas pelo agrupamento de várias células secretoras, estando ligadas entre si por meio de vários canalículos coletores, e à placa hipofaríngea por um cribelo; sendo bastante semelhantes às encontradas em *Atta capiguara* (Gonçalves) e *P. striata* (GAMA; CRUZ-LANDIM 1982). Já as glândulas hipofaríngeas de *C. vittatus* também eram formadas pelo agrupamento de várias células secretoras, porém, alongadas e com aspecto de cacho, estando ligadas à placa hipofaríngea por meio de um longo canal excretor geral; semelhante ao encontrado em *C. rufipes* (GAMA; CRUZ-LANDIM 1982). A função das glândulas hipofaríngeas não está definida nas formigas (GAMA 1985), contudo, em outros insetos sociais, como *Apis mellifera* (Linnaeus), elas produzem o alimento que é oferecido às rainhas e larvas, conhecido popularmente como geléia real (SIMPSON 1960).

A morfologia externa das GPF não parece sofrer grandes modificações em espécies do mesmo gênero, entretanto, como detalhado anteriormente, em alguns casos essas glândulas podem ser semelhantes ou completamente diferentes das encontradas em outros gêneros de formigas.

8.2. Ultraestrutura das glândulas pós-faríngeas (GPF)

As GPF de todas as subfamílias estudadas são formadas basicamente por um epitélio monoestratificado cuja altura das células foi variável de acordo com a espécie. O lúmen de toda a glândula encontrou-se revestido por uma cutícula dividida em três regiões: epicutícula, camada densa e homogênea, a exocutícula apresentou-se como uma camada composta por fibras sem direção preferencial, e a endocutícula constituída por pequenas fibras horizontais. A principal diferença encontrada foi que a que endocutícula de *A. laevigata* é

maior que a *P. villosa*, ao passo que a exocutícula desta última é mais pronunciada em relação às demais espécies. A cutícula das espécies estudadas não apresentou diferenças marcantes em relação a outras espécies de formigas (GAMA 1985; SOROKER et al. 1994; SCHOETERS; BILLEN 1996; BUENO 2005).

Na região apical do epitélio que está intimamente associada à cutícula foi observado a presença de reentrâncias e inúmeras vilosidades, as quais devem auxiliar na absorção do material que se encontra no lúmen das glândulas (JUNQUEIRA; CARNEIRO 2008). Além disso, nesta região foi possível observar especializações da membrana plasmática, os contatos focais, que são estruturas que conferem adesão e funcionam como ancoramento das vilosidades à cutícula das GPF (ALBERTS et.al. 2004).

Em todas as espécies de formigas analisadas foram encontradas muitas mitocôndrias, de diferentes tamanhos e formas, espalhadas por todo o citoplasma das GPF. Isto reforça os estudos de diversos pesquisadores que mostraram que esta é a organela mais abundante encontrada nas GPF de formigas (ZYLBERBERG et al. 1974; FALCO 1992; SOROKER et al. 1994; SCHOETER; BILLEN 1996; CAETANO et al. 2002). Entretanto, não foi observado a produção de lipídeos a partir das mitocôndrias ou a sua degradação, como descrito por Caetano et al. (2002) para a formiga *D. australis*.

O retículo endoplasmático liso e granuloso estavam presentes em baixa quantidade, ao passo que nunca foi encontrado complexo golgiense no citoplasma das células. Diferente do observado em outras espécies de formigas, como *Cataglyphis niger* (André) (SOROKER et al. 1994) e *C. rufipes*

(Gama 1985). Nestas espécies, a presença dessas organelas estaria relacionada ao processamento de substâncias lipossolúveis, tais como os hidrocarbonetos presentes no interior das GPF. Considerando que grande parte do conteúdo presente no interior das GPF de formigas são hidrocarbonetos (ATTYGALE et al., 1985; BAGNERES; MORGAN 1991; SOROKER et al. 1994), era esperado que fosse encontrado uma maior quantidade de retículo endoplasmático e complexo golgiense. Por outro lado, sabe-se que a síntese e acúmulo de hidrocarbonetos depende da idade do indivíduo, sendo que nas operárias mais velhas estes compostos estão em maior quantidade (SOROKER et al. 1994). Nesse sentido, é possível que as operárias utilizadas no presente estudo fossem jovens, fato que explicaria a ausência do complexo golgiense em suas GPF.

Na análise ultraestrutural de *C. vittatus*, a principal característica observada nas GPF desta espécie foi a presença de grânulos de glicogênio no interior de algumas vesículas. A função do glicogênio nas células animais é de armazenar glicose, e liberá-la rapidamente quando a célula precisar de energia (VOET; VOET 2010). As vias normais de produção de glicogênio ocorrem a partir do acúmulo de glicose, entretanto, é possível sintetizar essa molécula a partir do glicerol que faz parte dos lipídeos (NELSON; COX 2008). Isto sugere que as GPF de *C. vittatus* podem ser um sítio de reserva energética para o indivíduo, como descrito para a formiga *C. niger* (SOROKER 1995). E o fato do glicogênio estar concentrado no interior de vacúolos explicaria a natureza deste material (hidrossolúvel), que necessitaria estar separado do restante do citoplasma, que possui uma grande quantidade de moléculas lipossolúveis.

Outras organelas que foram encontradas no citoplasma das células de todas as espécies analisadas foram os ribossomos e os peroxissomos. De acordo com Bueno (2005) a presença de um grande número de ribossomos livres e polirribossomos é característica de células que produzem proteínas para uso próprio e não para exportação. Já em relação aos peroxissomos, trata-se de uma organela membranosa que vista ao MET apresenta uma região mais eletrondensa. Esta região é denominada de cristalóide, e resulta da cristalização progressiva das catalases ou urato oxidases existentes na matriz do peroxissomo (ALBERTS et al. 2004).

De forma semelhante às mitocôndrias, os peroxissomos são importantes sítios de utilização de oxigênio. A principal função das reações oxidativas que ocorrem nesta organela é a quebra das moléculas de ácidos graxos por meio de um processo denominado beta oxidação. Neste processo, os ácidos graxos de cadeia longa são quebrados em várias moléculas de dois átomos de carbono cada, acetil-CoA, de forma a facilitar a sua degradação subsequente pelas mitocôndrias. Esta quebra ocorre utilizando oxigênio molecular e tem como um de seus produtos finais peróxido de hidrogênio, que é tóxico para a célula, e precisa ser convertido rapidamente em água e oxigênio pelas catalases armazenadas nos peroxissomos (ALBERTS et. al 2004; NELSON; COX 2008; COOPER; HAUSMAN 2009). Desta forma, pode-se dizer que os peroxissomos têm papel fundamental no metabolismo e quebra dos lipídeos que são armazenados no interior das GPF das formigas aqui analisadas. Apesar disso, não foi observada a atuação direta destas organelas sobre o ácido oléico ingerido.

De maneira geral, o epitélio de *A. laevigata*, *C. vittatus* e *P. villosa* apresentaram muitas semelhanças, entretanto, deve-se destacar algumas estruturas que foram encontradas somente nas células de uma delas. O citoplasma das células das GPF de *P. villosa* apresentou estruturas que não foram encontradas nas outras espécies, como por exemplo: corpos multilamelados que estão associados ao reaproveitamento das membranas que recobrem as diferentes partes da célula; lisossomos: que são organelas que contêm enzimas digestivas utilizadas na renovação e digestão de componentes celulares; e os autofagossomos: que são vesículas formadas por membranas derivadas do retículo endoplasmático e que circundam pequenas partes do citoplasma ou organelas celulares, com a finalidade de degradar proteínas ou organelas não-essenciais, de maneira que seus componentes possam ser reutilizados (COOPER; HAUSMAN 2009). Isto pode ser comparado com o estudo apresentado por Caetano (2002), no qual foi descrito que, por se tratar de um local onde ocorre o processamento e metabolismo de lipídeos, as GPF de *D. australis* apresentam uma grande quantidade de peroxissomos e lisossomos.

Outra característica que deve ser discutida e enfatizada, é que a análise ultraestrutural das GPF de *P. villosa* revelou que elas são constituídas por dois tipos de células distintas. Os autofagossomos, encontrados em ambas as células, indicam que o epitélio está em processo de renovação de organelas, provavelmente de suas mitocôndrias e peroxissomos, já que essas estruturas apresentam grande atividade na oxidação dos lipídeos presentes nas GPF. Além disso, é possível que a renovação do epitélio seja consequência da beta oxidação realizada nos peroxissomos, que têm como um de seus produtos

peróxido de hidrogênio, substância tóxica para a célula. Considerando o grande número de peroxissomos encontrados na célula-A, é possível que esta região do epitélio seja responsável pela quebra inicial dos lipídeos ingeridos pelo inseto, sendo que posteriormente os produtos resultantes deste metabolismo sejam exportados para a célula-B, para terminarem de ser oxidados em suas inúmeras mitocôndrias. Deve ser ressaltado que, até o presente momento, não havia registros na literatura que apresentassem diferenças entre duas células que constituem o epitélio das GPF. Nesse sentido, se considerarmos que os Poneromorfos (*P. villosa*) são considerados espécies plesiomórficas em relação às espécies da tribo Attini (*A. laevigata*) (BOLTON 2003), pode se dizer que as operárias de *P. villosa* apresentam uma maneira distinta de utilizar os lipídeos ou eliminar o seu excesso em relação à espécies apomórficas como *A. laevigata*. Duas evidências que suportam esta hipótese foram descritas no presente estudo: 1- Foram encontradas células eliminando o conteúdo das GPF na hemolinfa; 2 - Presença de dois tipos de células no epitélio das GPF.

8.3. Bioensaios

8.3.1. Corantes vitais: distribuição da Rodamina B (Reagent)

A Rodamina foi eficiente para indicar o trajeto percorrido pela solução de água e mel no interior do sistema digestório das operárias de todas as espécies estudadas. Sem exceção, o trajeto percorrido compreendeu a cavidade infrabucal (CIB), o papo, o ventrículo e o reto.

Nas três espécies de formigas estudadas o alimento passou rapidamente pela CIB e foi filtrado, já que foram encontradas somente partículas sólidas nessa estrutura. Assim, pequenas impurezas presentes na solução de

água e mel foram retidas na **CIB** e apenas a parte líquida foi ingerida. Este comportamento já foi observado em outras espécies de formigas como *P. fulva*, *L. humile* e *T. melanocephalum* (Jesus 2006) e sua principal função é eliminar eventuais partículas sólidas que eventualmente possam ser ingeridas e, assim, bloquear a passagem de alimento do papo para o intestino médio (FEBVAY; KERMARREC 1981; BUENO et al. 2008).

Os mecanismos de ingestão e filtração do alimento já foram descritos por alguns pesquisadores (JANET 1895; FEBVAY; KERMARREC 1981; GLANCEY et al. 1981; BUENO 2005). De acordo com estes estudos, o alimento ingerido entra primeiramente na cavidade infrabucal, uma vez que no ato da alimentação a abertura oral está fechada, e posteriormente, quando ocorre a retração das peças bucais (fechando a cavidade pré-oral), a musculatura da faringe provoca uma pressão negativa e o alimento presente na **CIB** entra na boca. Durante este processo, o alimento é forçado a passar por uma série de projeções cuticulares espalhadas por toda a **CIB** e parte da faringe, que atuam como uma peneira, retendo as partículas sólidas (GLANCEY et al. 1981; BUENO et al. 2008). O resultado da filtração é a eliminação das partículas sólidas sob a forma de um “pellet” (Janet 1895).

Diferentes de outras espécies de formigas já estudadas (GLANCEY et al. 1981; JESUS 2006) as operárias de *A. laevigata*, *C. vittatus* e *P. villosa* não regurgitaram “pellets” durante as 72 horas que permaneceram isoladas das colônias. Isto foi comum em todos bioensaios utilizando tanto Rodamina quanto o Sudan Black. Entretanto, é difícil estabelecer uma comparação entre os dados encontrados no presente trabalho com outras espécies de formigas, devido a, praticamente, a inexistência de estudos relacionados às condições

necessárias para que um pellet seja eliminado. Apesar dos mecanismos de filtração terem sido pouco estudados, sabe-se que o tamanho das partículas que são retidas na **CIB** variam de 45 μm a 150 μm em *C. pennsylvanicus* (EISNER; HAPP 1962; CANNON 1998), de até 10 μm em operárias mínimas de *A. octospinosus* (QUINLAN; CHERRETT 1978), sendo retidas partículas entre 0,88 μm a 1,8 μm em operárias mínimas de *S. invicta* (GLANCEY et al. 1981), até partículas pouco maiores que 1 μm em *A. sexdens rubropilosa* (BUENO 2005). No presente trabalho não foi verificado o tamanho das partículas que cada uma das espécies é capaz de filtrar.

As operárias de *A. laevigata*, *C. vittatus* e *P. villosa* não regurgitaram a solução de água e mel ingerida em nenhum dos tempos analisados. Isto indica que elas utilizam os compostos hidrossolúveis de forma diferente que outras espécies de formigas como *T. melanocephalum*, *L. humile* e *P. fulva* (JESUS 2006).

Não foi observado a presença de Rodamina nas **GPF** das operárias. A ausência do marcador nesta estrutura foi comum para todas as espécies estudadas. Isto sugere que as substâncias açucaradas solúveis em água utilizadas neste estudo não se deslocam para as **GPF**. Trabalhos relacionados à alimentação das formigas nunca constataram a presença de compostos hidrossolúveis no interior das **GPF** (PEREGRINE; MUDD 1974; DELAGE-DARCHEN 1976; VINSON et al. 1980; BAGNÈRES; MORGAN 1991; BUENO 2005).

Continuando o trajeto percorrido pela Rodamina, após a **CIB** o alimento foi encontrado no papo das operárias, e devido a sua capacidade de expansão, essa estrutura foi responsável pelo armazenamento de praticamente todo o

alimento ingerido. De acordo com Treherne (1967) e Cannon (1998), o papo é o local ideal para o armazenamento dos recursos alimentares, uma vez que ele é revestido por uma camada de cutícula impermeável que não permite a absorção dos nutrientes.

Em todos os casos, parte do alimento armazenado no papo foi transferido para o intestino médio das operárias, região diretamente envolvida na produção e secreção de enzimas digestivas, bem como na absorção dos alimentos ingeridos (CHAPMAN 1998). Apesar da quantidade de Rodamina transferida para o ventrículo ter sido pequena, isto indica que as operárias de todas as espécies analisadas no presente estudo utilizam os carboidratos da mesma forma que espécies como *P. fulva*, *M. pharaonis*, *T. melanocephalum* e *L. humile* (JESUS 2006).

A maioria dos trabalhos presentes na literatura compara apenas a quantidade de lipídeos, carboidratos e proteínas ingeridos pelas operárias, e sua distribuição entre as diferentes castas da colônia. Por outro lado, a taxa de passagem de alimento de uma estrutura para outra do sistema digestório foi estudada somente em oito espécies de formigas. Como exemplo pode ser citado o trabalho realizado por Howard e Tschinkel (1981), no qual foi observado em *S. invicta* que a digestão dos carboidratos ocorre após alguns segundos do alimento ter sido ingerido. Porém, os níveis de maior atividade do ventrículo foram estabelecidos entre 6 e 24 horas. Para a espécie *C. pennsylvanicus*, a digestão dos carboidratos nos intestinos médio e posterior ocorreu de forma tênue entre 4 e 16 horas, apresentando valores acentuados somente após 20 horas (CANNON 1998). Recentemente, Erthal et al. (2004) ofereceram uma dieta contendo o marcador Azul de Evans para *Acromyrmex*

subterraneus (Forel) e observaram que o papo, ventrículo e o íleo das operárias foram corados em apenas 30 segundos.

No presente estudo, o tempo que a dieta levou para passar do papo para o ventrículo variou de acordo com a espécie considerada. Em *A. laevigata* este deslocamento ocorreu após 2 horas; em *C. vittatus* foi registrado a passagem de alimento do papo para o ventrículo após 8 horas, ao passo que nas operárias de *P. villosa* a solução de água e mel foi encontrada no ventrículo somente após 12 horas. Além disso, nesta última a dieta levou mais tempo para ser encontrada no reto, somente após 72 horas. Neste local, são atribuídas as funções de reabsorção de água (WALL; OSCHMAN 1975) e dos monossacarídeos que não foram absorvidos no ventrículo (CHAPMAN 1998). Já nas espécies de formigas analisadas por Jesus (2006), este tempo variou entre 2 e 4 horas. Assim, pode-se dizer que existe uma grande variação no tempo que cada uma dessas espécies de formigas levam para absorver os alimentos hidrossolúveis.

8.3.2. Corantes vitais: distribuição do Sudan Black

O Sudan Black também se mostrou eficiente e indicou as estruturas que óleo de soja atingiu no interior do sistema digestório das operárias. Sem exceção, o trajeto percorrido compreendeu a cavidade infrabucal (cIB), as glândulas pós-faríngeas e o papo. Porém, em um caso particular também atingiu o ventrículo.

Sempre foram encontrados pellets no interior da cIB das operárias, sendo que o Sudan Black estava associado aos restos de alimento presentes nesta estrutura. Isto indica que o alimento foi filtrado na cIB, as partículas

sólidas foram retidas, e somente a parte líquida foi ingerida. Nestes bioensaios, em nenhum momento as operárias regurgitaram pellets, diferente de outras espécies de formigas como *P. fulva* e *T. melanocephalum*, que eliminaram pellets depois de somente 10 minutos e 24 horas, da ingestão de uma dieta, respectivamente (JESUS 2006). Assim, os indivíduos podem tanto esvaziar a CIB em apenas alguns minutos, quanto permanecer com um “pellet” por mais de 72 horas, mostrando que este comportamento pode variar de espécie para espécie.

Diferente da ingestão da solução de água e mel, foi encontrado óleo de soja nas GPF de todas as operárias. Sendo que em todos os tempos analisados, ela foi a estrutura que apresentou a maior quantidade de óleo de soja. Entretanto, também foi encontrado uma pequena quantidade de óleo de soja no papo das operárias. Isto mostra que os lipídeos, quando em baixa quantidade (foram aplicados 5µl de alimento) entram diretamente nas GPF, até que seu lúmen esteja repleto de alimento, momento em que o restante é direcionado para o papo. Estes resultados corroboram os estudos de Phillips e Vinson (1980b), Bueno (2005) e Jesus (2006) para as espécies *S. invicta*, *A. sexdens rubropilosa* e *T. melanocephalum*, respectivamente. Entretanto, deve ser lembrado que os lipídeos quando ingeridos em grande quantidade são deslocados para o papo, mas não passam para o ventrículo (com exceção de *A. laevigata*), e posteriormente, voltam pelo esôfago e entram nas GPF.

Um fato marcante observado neste bioensaio é presença de uma pequena quantidade de Sudan Black no ventrículo e no reto das operárias de *A. laevigata* após oito horas da ingestão do óleo de soja. Apesar de ter sido apenas uma pequena quantidade de alimento, isto sugere que esta espécie

pode metabolizar compostos lipídicos no intestino médio. Evento não descrito na literatura para as espécies de formiga conhecidas. Como já descrito, trabalhos realizados com diferentes grupos de formigas mostraram que compostos lipídicos são direcionados e/ou metabolizados nas GPF (BUENO 2005), ou armazenados temporariamente no papo, mas nunca passam para o intestino médio e posterior (PHILLIPS; VINSON 1980; JESUS 2006). Este resultado sugere que *A. laevigata* desenvolveu uma estratégia diferente para utilizar os lipídeos ingeridos. Considerando estes fatos, e outros já descritos anteriormente (itens 7.1 e 7.2), surgem duas perguntas: 1 - Será que *A. laevigata* desloca parte dos lipídeos para os intestino médio e posterior a fim de evitar o excesso deste tipo de alimento nas GPF ?; 2 - No mesmo sentido estariam as operárias de *P. villosa*, que não deslocam os lipídeos para o mesêntero, mas que talvez possuam células especializadas em direcionar tais compostos rapidamente para a hemolinfa ?. Essas questões são intrigantes e podem abrir novos caminhos para o entendimento das funções desempenhadas pelas GPF nas diferentes espécies de formigas existentes.

8.3.3. Autorradiografia

A análise autorradiográfica realizada com as operárias de *A. laevigata* foi eficiente em mostrar detalhadamente, não só o caminho percorrido pelo ácido oléico, mas também o tempo necessário para que ele seja absorvido pelas GPF.

Os resultados apresentados no presente estudo mostram que os principais processos que ocorreram ao longo de 72 horas foram o deslocamento do ácido oléico do lúmen para o interior das GPF, o seu acúmulo e posterior passagem para a hemolinfa. Uma vez ingerido, o óleo de soja

contendo o ácido oléico tritiado penetrou rapidamente nas **GPF** de *A. laevigata*, e após dez minutos já havia marcações distribuídas por todo o lúmen, inclusive próximas à cutícula.

As marcações encontradas sobre a cutícula que estavam localizadas próximas à região apical do epitélio mostram que a absorção do ácido oléico ocorre por simples difusão, e se inicia a partir de uma hora. Este tipo de difusão através da cutícula é feito sem o gasto de energia, devido às diferenças de concentração, presença de vilosidades, e constituição da própria cutícula (CHAPMAN 1998). Em duas horas, uma pequena parte do material que atravessou a cutícula já se encontrava no interior do epitélio e, no decorrer das próximas 72 horas há um aumento rápido da quantidade de vesículas marcadas pelo trítio no epitélio das **GPF** e fica evidente a movimentação do ácido oléico da região apical para a basal. Em operárias de *A. sexdens rubropilosa* foi observado o mesmo padrão de deslocamento e armazenamento de lipídeos (BUENO 2005). Ainda neste mesmo estudo, Bueno (2005), sugere que a maioria dos lipídeos permanece armazenada no lúmen das **GPF** e necessita primeiro ser metabolizado para depois ocorrer sua absorção. Entretanto, considerando que na presente pesquisa não foram encontradas evidências da utilização ou modificação do ácido oléico pelas organelas celulares, é provável que isto não ocorra em *A. laevigata*. Já que, por se tratar de um lipídeo simples, o ácido oléico não passaria por um processamento complexo antes de ser armazenado ou utilizado. Por outro lado, Vinson et al. (1980) sugeriu que as **GPF** de *S. invicta* atuam como cecos cefálicos absorvendo os compostos lipídicos que estão presentes em seu sistema digestório. Tanto o presente trabalho quanto o realizado por Bueno (2005)

reforçam essa função às GPF. Entretanto, de acordo com Chapman (1998), cecos cefálicos são estruturas que tem origem mesodérmica, como o intestino médio dos insetos. Considerando que as GPF são de origem ectodérmica, a terminologia utilizada por Vinson et al. (1980) não é adequada.

Outra característica que reforça a idéia dessas glândulas atuarem como “cecos cefálicos” é o fato de sempre existir uma camada de corpo gorduroso recobrando a superfície externa das GPF de *A. laevigata*, *C. rufipes* e *P. villosa*. Entretanto, deve ser ressaltado que foi observado que o epitélio das GPF foi drasticamente alterado devido ao acúmulo de ácido oléico em seu interior. Sendo que as principais mudanças que ocorreram podem ser notadas analisando-se o citoplasma das células. Dentre essas mudanças, destacam-se o deslocamento e compactação das organelas citoplasmáticas, a deformação do núcleo, e a expansão do epitélio. Schoeters e Billen (1996) relataram que a morfologia das GPF de *D. australis*, assim como os processos de secreção das células epiteliais, são alterados devido a presença de uma grande quantidade de lipídeos em seu interior. Nesse sentido, é provável que estas mudanças alterem a forma com que os lipídeos são processados, sendo necessário utilizar outros compostos marcados radioativamente na tentativa de estabelecer outros caminhos que podem ser utilizados pelas células das GPF para processar os lipídeos ingeridos.

9. Considerações Finais e Conclusões

A Tabela 7 apresenta uma comparação dos principais resultados encontrados no presente projeto. Além disso, é possível que a musculatura da faringe e esôfago ajudem na contração e movimento da placa hipofaríngea, fazendo com que a dieta que está sendo ingerida seja deslocada para dentro das GPF, ou então, siga pelo esôfago até o papo.

Tabela 7. Trajeto dos alimentos pelo sistema digestório das operárias, morfologia e organização básica do epitélio das glândulas pós-faríngeas de *Atta laevigata*, *Camponotus vittatus* e *Pachycondyla villosa*.

	<i>Pachycondyla villosa</i>	<i>Camponotus vittatus</i>	<i>Atta laevigata</i>
Trajeto dos alimentos hidrossolúveis	Cavidade infrabucal, papo, ventrículo e reto (pág. 84)	Idem (pág. 83)	Idem (pág. 82)
Trajeto dos lipídeos	Cavidade infrabucal, glândulas pós-faríngeas e papo (pág. 88)	Idem (pág. 87)	Idem, porém atingem o ventrículo (pág. 86)
GPF	Com células especializadas na eliminação de lipídeos (pág. 55)	Local de reserva energética (glicose) (pág. 69 e 70)	Evitam o acúmulo de lipídeos nas GPF deslocando-os para o intestino médio (pág. 86)
Morfologia	Não apresentam digitações, sendo lobuladas (pág. 53)	Apresentam de 30 a 63 digitações alongadas (pág. 44)	Apresentam de 50 a 71 digitações pouco alongadas (pág. 39)
Organização básica do epitélio	Epitélio monoestratificado com membrana basal acelular e região apical apresentando uma cutícula menos espessa que a de <i>A. laevigata</i> (pág. 72)	Idem, apresentando uma cutícula semelhante a encontrada em <i>A. laevigata</i> (pág. 69)	Idem, porém apresentando uma cutícula espessa (pág. 64)

Considerando a Tabela 7 e os demais resultados apresentados pode-se concluir que:

- Os corantes vitais são formas eficientes de mostrar de forma indireta o caminho percorrido pelos alimentos no interior do sistema digestório de formigas.
- O trajeto dos alimentos hidrossolúveis compreende a cavidade infrabucal, papo, ventrículo e reto; ao passo que os alimentos de origem lipídica passam pela cavidade infrabucal, glândulas pós-faríngeas e papo, mas não atingem o ventrículo; com exceção das operárias de *Atta laevigata* que aparentemente desenvolveram mecanismos diferentes para utilizar os lipídeos ingeridos.
- Uma das funções primordiais das GPF das operárias de *Atta laevigata* é absorver e armazenar os lipídeos que entram no sistema digestório, para posteriormente deslocá-los para a hemolinfa. Se a quantidade de lipídeos ingerida for grande, o excesso é deslocado para o intestino médio a fim de ser eliminado.
- As glândulas pós-faríngeas de *Camponotus vittatus* podem ser um sítio de reserva energética para o indivíduo uma vez que foram encontrados grânulos de glicogênio em seu interior.
- Pela primeira vez foi observado dois tipos de células nas glândulas pós-faríngeas de *Pachycondyla villosa*.

10. Referências bibliográficas

- ABE, T. 1982. Ecological role of termites in a tropical rain forest. In: BREED D.; MICHENER, C. D.; EVANS, H. E. (Eds.). **The biology of social insects**. Boulder, Colorado: Westview Press. p. 71-75.
- ALBERTS, B. et al. 2004. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2ª Edição. Porto Alegre: Editora Artmed, p.346
- ANDRADE, A. P. P. 1997. **Comportamento forrageiro e aprendizado de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) em condições de campo e laboratório**. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista AJúlio de Mesquita filho@, Botucatu, SP.
- ANDRADE, A. P. P.; FORTI, L. C., MOREIRA, A. A., BOARETTO, M. A. C., RAMOS, V. M.; MATOS, C. A. O. 2002. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiol.** v. 40, p. 293-306.
- AYRE, G. L. 1963. Feeding behaviour and digestion in *Camponotus herculeanus* (L.) (Hymenoptera: Formicidae). **Entomol. Exp. Appl.** v. 6, p. 165–170.
- AYRE, G. L. 1967. The relationships between food and digestive enzymes in five species of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Canad. Entomol.**, v. 99, p. 408–411.
- BAGNÈRES, A. G.; MORGAN, E. D. 1991. The post-pharyngeal glands and the cuticle of Formicidae contain the same characteristic hydrocarbons. **Experientia.** v. 47, p. 106-111.
- BIENZ, K. A. 1977. Techniques and applications of autoradiography in the light and electron microscope. **Microsc. Acta.** v. 79, p. 1-22.
- BLUMEN, G.; MERZEL, J. 1976. Radioautografia: princípios, aplicações e técnicas. Piracicaba, São Paulo: Faculdade de odontologia de Piracicaba (Unicamp). 96 p. BOLTON, B. 2003. Synopsis and classification of Formicidae. **Mem. Amer. Entomol. Inst.** v. 71, p. 1-370.
- BOLTON, B. 1995. **A new general catalogue of the ants of the world**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. 504 p.
- BOLTON, B. 2003. Synopsis and classification of Formicidae. **Mem. Amer. Entomol. Inst.** v. 71, p. 1-370.
- BUENO, O. C. 2005. **Filtro infrabucal e glândulas pós-faríngeas da saúva-limão *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae)**. 107f. Tese (Livre Docente) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista AJúlio de Mesquita filho, Rio Claro, SP.
- BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; DINIZ, E. A.; SCHNEIDER, M. O. Utilização de alimentos pelas formigas-cortadeiras. In: VILELA, E. F.; SANTOS, I. A.; SCHOEREDER, J. H.; SERRÃO, J. E.; CAMPOS, L. A. O.; LINO-NETO, J. **Insetos Sociais: a biologia à aplicação**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2008. p. 96 -114.
- CAETANO, F. H. 1988. Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera: Formicidae). **Naturalia.** v. 13, p. 129-174.
- CAETANO, F. H. 1990. Morphology of the digestive tract and associated excretory organs of ants. In: VANDER MEER, R. K; JAFFÉ K. (Ed.). **Applied Myrmecology: a world perspective**. Boulder: Westview Press. p 119B132.
- CAETANO, F. H. 1998. **Aspectos ultramorfológicos, ultra-estruturais e enzimológicos da glândula pós-faríngea de *Dinoponera australis* (Formicidae: Ponerinae)**. 137 f. Tese (Livre

Docente) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista AJúlio de Mesquita filho@, Rio Claro, SP.

CAETANO, F. H., JAFFÉ, K.; ZARA, F. J. 2002. **Formigas: biologia e anatomia**. Araras, São Paulo: Gráfica e Editora Topázio. 131 p.

CANNON, C. A. 1998. **Nutritional ecology of the carpenter ant *Camponotus pennsylvanicus* (De Geer): macronutrient preference and particle consumption**. 147 f. Tese (PhD) – Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA

CARO, L. G.; VAN TUBERGEN, R.P. 1962. High resolution autoradiography I. Methods. **J. Cell. Biol.** v. 15, p. 173-188.

CHAPMAN, R. F. 1998. **The insects: structure and function**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. 770p.

CHERRETT, J. M. 1982. The economic importance of leaf-cutting ants. In: BREED D.; MICHENER, C. D.; EVANS, H. E. (Eds.). **The biology of social insects**. Boulder, Colorado: Westview Press. p. 114-118.

COOPER, G.M.; HAUSMAN, R.E. 2009. **The cell: A Molecular Approach**, 5ª ed., Sinauer Associates Inc., p 771

CRUZ-LANDIM, C.; MOTA, H.V.B. 1990. Occurrence of tegumentary glands in stingless bees. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae), p. 587-588. In: VEERESH, G.K.; MALLIK, B.; VIRAKTAMATH C.A. (eds.), **Social insects and the environment**. New Delhi, Oxford & IBH Publishing Co.,765p.

DALY, J. W. 1998. Thirty years of discovering arthropod alkaloids in amphibian skin. **J. Nat. Prod.** v. 61, p. 162–172.

DELAGE-DARCHEN, B. 1976. Les glandes post-pharyngiennes des fourmis: connaissances actuelles sur leur structure, leur fonctionnement, leur rôle. **Ann. Biol.** v. 15, n. 1-2, p. 63-76.

DZIEWIATKOWSKI, D. D. 1949. On the utilization of exogenous sulfate sulfur by the rat in the formation of ethereal sulfates as indicated by the use of sodium sulfate labeled with radioactive sulfur. **J. Biol. Chem.** v. 178, p. 383-393.

ECHOLS, H. W. 1966. Assimilation and transfer of Mirex in colonies of Texas leaf-cutting ants. **J. Econ. Entomol.** v. 59, p. 1336-1338.

EISNER, T. 1957. A comparative morphological study of the proventriculus of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Bull. Mus. Comp. Zool.** v. 116, p. 441-490.

EISNER, T.; BROWN, W. L. Jr. 1958. The evolution and social significance of the ant proventriculus. In: International Congress of Entomology, 10 , **Proceedings th of 10th Intl. Congr. Entomol.** p. 2: 503-508.

EISNER, T.; HAPP, G. M. 1962. The infrabuccal pocket of a formicinae ant: a social filtration device. **Psyche.** v. 69, n. 3, p. 107-116.

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

FALCO, J. R. 1992 **Comparação ultraestrutural entre as glândulas pós-faríngeas de *Camponotus rufipes* (Hymenoptera : Formicidae) parasitadas e não parasitadas por nematóides**. Rio Claro. Monografia de Bacharelado, Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro. 70p.

FEBVEY, G. F.; KERMARREC, A. 1981. Morphologie et fonctionnement du filtre infrabuccal chez une Attine *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae): role de la ponche infrabuccale. **Int. J. Ins. Mor. Embry.** v. 10, n. 5-6, p. 441-449.

FOWLER, H. G., FORTI, L. C., BRANDÃO, C. R. F., DELABIE, J. H. C.; VASCONCELO, H. L. 1991. Ecologia nutricional de formigas. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo, SP: Manole. p. 131-223.

GAMA, V. 1976. **Desenvolvimento pós-embrionário das glândulas componentes do sistema salivar de *Camponotus (Myrmotrix) rufipes* (Fabricius, 1775) (Hymenoptera: Formicidae)**. 26 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

GAMA, V., CRUZ LANDIM, C. 1982. Estudo comparativo das glândulas do sistema salivar de formigas (Hymenoptera, Formicidae). **Naturalia**. v. 7, p. 145-165.

GAMA, V. 1985. O sistema salivar de *Camponotus rufipes* (Fabricius, 1775), (Hymenoptera: Formicidae). **Rev. Brasil. Biol.** v. 45, n. 3, p. 317-359.

GOULET, H. ; HUBER, J.T. 1993. **Hymenoptera of the world: an identification guide to families**. Ontario: Agriculture Canada Publication, 668p

GLANCEY, B. M., STRINGER, C. E. Jr., CRAIG, C. H., BISHOP, P. M.; MARTIN, B. B. 1973. Evidence of a replete caste in the fire ant *Solenopsis invicta*. **Ann. Entomol. Soc. Am.** v. 66, n. 1, p. 233-234.

GLANCEY, B. M., VANDER MEER, R. K., GLOVER, A., LOFGREN, C. S.; VINSON S. B. 1981. Filtration of microparticules from liquids ingested by the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. **Ins. Soc.** v. 28, n. 4, p. 395-401.

GOTWALD, W. H. 1969. Comparative morphological studies of the ants, with particular reference to the mouthparts (Hymenoptera: Formicidae). **Mem. Cornell Univ. Agric. Exp. Station**. n. 408, p. 1-150.

HÖLDOBLER, B.; WILSON, E. O. 1990. **The ants**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. 732 p.

HÖLDOBLER, B.; WILSON, E. O. 1994. **Journey to the ants: a story of scientific exploration**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. 228 p.

HOUSE, H. L. 1974. Nutrition. In: ROCKSTEIN, M. (Ed.). **The physiology of insecta**. New York: Academic Press. p. 1-62.

HOWARD, F. D.; TSCHINKEL, W. R. 1980. The effect of colony size and starvation on food flow in the fire ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). **Behav. Ecol. Sociobiol.** v. 7, p. 293-300.

HOWARD, F. D.; TSCHINKEL, W. R. 1981a. The flow of food in colonies of the fire ant *Solenopsis invicta*: a multifactorial study. **Physiol. Entomol.** v. 6, p. 297-306.

HOWARD, F. D.; TSCHINKEL, W. R. 1981b. Internal distribution of liquid foods in isolated workers of the fire ant, *Solenopsis invicta*. **J. Insect. Physiol.** v. 27, p. 67-74.

JANET, C. 1895. Etudes sur les fourmis. 8/ note. Sur l'organe de nettoyage tibiotarsien de *Myrmica rubra* L., race levinodis Nyl. **Ann. Soc. Ent. Fr.** v. 63, p. 691-704.

JANET, C. 1905. **Anatomie de la tête du *Lasius niger***. Paris: Limoges Imprimeire-libraire Ducourtieux et Gout. 40 p.

JESUS, C. M. 2000. Substâncias atrativas para a formiga *Tapinoma melanocephalum* Fabricius, 1793. **XII Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, São José do Rio Preto, SP.

JESUS, C. M. 2006. **Utilização de alimentos contendo substâncias lipídicas e açucaradas por formigas urbanas**. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, SP.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. 2008. **Histologia Básica**. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 540.

KAIB, M.; EISERMANN, B.; SCHOETERS, E.; BILLEN, J.; FRANKE, S.; FRANCKE, W. 2000. Task-related variation of postpharyngeal and cuticular hydrocarbon composition in the ant *Myrmica eumenoidea*. **J. Comp. Physiol. A**. v. 186, p. 939-948.

LAGE, G. 1980. Auto-radiografia quantitativa à nível de microscopia eletrônica em células de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) Infectadas com vírus do anel do pimentão. 108 f. Dissertação (Mestrado) - escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

LEBLOND, C.P. 1965. The time dimension in histology. **Am. J. Ant.** v. 116, n. 1, p. 1-27.

LEDERER, M.; HOLLANDER, J.M.; PERLMANN, I. 1967: **Table of isotopes** 6th ed., Wiley and Sons. New York. p. 155.

LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. M. 1976. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bull Entomol Res**. 66: 205-217.

LOFGREN, C. S.; BANKS, W. A.; GLANCEY, B. M. 1975. Biology and control of imported fire ants. **Ann. Rev. Entomol.** v. 20, p. 1-30.

MARKIN, G. P. 1970. Food distribution within laboratory colonies of the argentine ant, *Iridomyrmex humilis*. **Ins. Soc.** v. 17, p. 127-158.

NELSON, D. L.; COX, M. M. 2008. **Principles of biochemistry**. 5th edition. New York : W.H. Freeman. 1263 p.

NOGUEIRA, N. L. 1978. **Determinação do sítio intracelular de síntese do RNA do vírus do anel do pimentão através de auto-radiografia a nível de microscopia eletrônica**. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

PARRA, J. R. P. 1991. Consumo e utilização de alimentos por insetos. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Ed.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo, SP: Manole. p. 9-66.

PAUL, J.; ROCES, F. 2003. Fluid intake rates in ants correlate with their feeding habits. **J. Ins. Physiol.** v. 49, p. 347-357.

PAULSEN, R. 1969. **Zur funktion der propharynx-, postpharynx- und labialdrüsen von Formica polyctena Foerst. (Hymenoptera: Formicidae)**. 90 p. Doctoral dissertation - Nat. Fak., Würzburg.

PELC, S. R. 1963. Teory of electron autoradiography. **J. Roy. Micr. Soc.** v. 81, p. 131-139.

PEREGRINE, D. J.; MUDD, A.; CHERRETT, J.M. 1973. Anatomy and preliminary chemical analysis of the post-pharyngeal glands of the leaf-cutting ant, *Acromyrmex octospinosus* (Reich.) (Hymenoptera. Formicidae). **Ins. Soc.** v. 20, n. 4, p. 355-363.

- PEREGRINE, D. J.; MUDD, A. 1974. The effects of diet on the composition of the post-pharyngeal glands of *Acromyrmex octospinosus* (Reich). **Ins. Soc.** v. 21, n. 4, p. 417-424.
- PETRALIA, R. S.; VINSON, S. B. 1978. Feeding in larvae of imported fire ant, *Solenopsis invicta*: behavior and morphological adaptations. **Ann. Entomol. Soc. Am.** v. 71, n. 4, p. 643-648.
- PETRALIA, R. S.; SORENSEN, A. A.; VINSON, S. B. 1980. The labial gland system of larvae of the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. **Cell. Tiss. Res.** v. 206, p. 145-156.
- PHILLIPS, S. A. 1979. **Physiology of the post-pharyngeal glands and comparative morphology of glands associated with the mouthparts among castes of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*** Buren. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Texas A&M University.
- PHILLIPS, S. A. Jr; VINSON, S. B. 1980a. Comparative morphology of glands associated with the head among castes of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, Buren. **Ga. Entomol. Soc.** v. 15, p. 215-226.
- PHILLIPS, S. A. Jr; VINSON, S. B. 1980b. Source of post-pharyngeal gland contents in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. **Ann. Ent Soc. Am.** v. 73, n. 3, p. 257-261.
- QUINLAN, R. J.; CHERRET, J. M. 1978. Studies on role of infrabuccal pocket of leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae). **Ins. Soc.** v. 25, n. 3. p. 237-245.
- SALPETER, M.M, BACHMANN, L., SALPETER, E.E. 1969. Resolution in electron microscope radioautography. **J. Cell. Biol.** v. 41, n. 3, p. 1-20.
- SAUX, C.; FISHER, B. L.; SPICER, G. S. 2004. Dracula ant phylogeny as inferred by nuclear 28S rDNA sequences and implications for ant systematics (Hymenoptera: Formicidae: Amblyoponinae). **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 33, p. 457-468.
- SCHNEIDER, M. O; BUENO. O. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C. 2000. Observations on brood care behaviours of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. **XXI Int. Congress Entomol.** Foz do Iguacu, PR., p. 895.
- SCHOETERS, E, BILLEN, J. 1996. The postpharyngeal gland in *Dinoponera* ants (Hymenoptera : Formicidae) : unusual morphology and changes during the secretory process. **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.** v. 25, p. 443-447.
- SIMPSON, J. 1960. The functions of the salivary glands of *Apis mellifera*. **J. Ins. Physiol.** v. 4, n. 2, p. 107-108.
- SOROKER, V., VIENNE, C., HEFETZ, A.; NOWBAHARI, E. 1994. The postpharyngeal gland as a Gestalt organ for nestmate recognition in the ant *Cataglyphis niger*. **Naturwissenschaften.** v. 81, n; 11, p. 510-513.
- SOESEN, A. A., MIRENDA, J. T.; VINSON, S. B.. 1981. Food exchange and distribution by three functional worker groups of the imported fire ant *Solenopsis invicta*. **Ins. Soc.** v. 28, p. 383-394.
- STEADMAN, S. 1995. STEADMAN'S MEDICAL DICTIONARY. 28th edition illustrated. Baltimore, Williams & Wilkins.
- STROHM, E.; HERZNER, G; GOETTLER, W. 2006. A 'social' gland in a solitary wasp? The postpharyngeal gland of female European beewolves (Hymenoptera, Crabronidae). **Art. Struc. Develop.** v. 36. p. 113-122.

- STROHM, E.; KALTENPOH, M.; HERZNER, G. 2010. Is the postpharyngeal gland of a solitary digger wasp homologous to ants? Evidence from chemistry and physiology. **Ins. Soc.** v. 57, p. 287-291.
- TERRA, W. R. 1991. Digestão do alimento e suas implicações na biologia dos insetos. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Ed.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo, SP: Manole. p. 67-92.
- TREHERNE, J. E. 1967. Gut absorption. **Ann. Rev. Ent.** v. 12, p. 43-58.
- TOBIN, J. E. Ants as primary consumers: diet and abundance in the Formicidae. In: HUN, J. H.; NALEPA, C. A. (Eds.) **Nourishment & Evolution in Insect Societies. Nourishment & evolution in insect societies**. Boulder: Westview Press, 1994, p.279-307.
- VALENZUELA-GONZALES, J.; LOPEZ-MENDES, A.; GARCÍA-BALLINAS, A. 1994. Ciclo de actividad y aprovisionamiento de *Pachycondyla villosa* (Hymenoptera, Formicidae) em agroecosistemas cacaoteros del soconusco, Chiapas, Mexico. **Folia Entomol Mex.** v. 75, p. 9-21.
- VANDER MEER, R. K., GLANCEY, B. M.; LOFGREN, C. S. 1982. Biochemical changes in the crop, oesophagus and postpharyngeal gland of colony-founding red imported fire ant queens (*Solenopsis invicta*). **Insect Biochem.** v. 12, p. 123-127.
- VINSON, S. B. 1968. The distribution of an oil, carbohydrate and protein food source to members of the red imported fire ant colony. **J. Econ. Entomol.** v. 61, p. 712-714.
- VINSON, S. B., PHILLIPS, S. A. Jr; WILLIAMS, J. 1980. The function of the post-pharyngeal glands of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, Buren. **J. Insect. Physiol.** v. 26, p. 645-650.
- VOET, D.; VOET, J. G. 2010. **Biochemistry**. 4th edition. Wiley Press. 1520 p.
- WALKER, J. R.; CLOWER, D. F. 1961. Morphology and histology of the alimentary canal of the imported fire ant queen (*Solenopsis saevissima richteri*). **Ann. Entomol. Sci. Am.** v. 54, p. 22-28.
- WALL, B.J.; OSCHMAN, J.L. 1975. Structure and function of the rectum in insects. **Fortschr Zool.** v. 23, p. 193-222.
- WEBER, N. A. 1972. **Gardening ants: the Attines**. Philadelphia: American Philosophical Society. 146 p.
- WEEKS, R. D. Jr, WILSON, L. T., VINSON, S. B.; JAMES, W. D. 2004. Flow of carbohydrates, lipids and protein among colonies of polygyne red imported fire ants, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.** v. 97, n. 1, p. 105-110.
- WHEELER, D. E. 1994. Nourishment in ants: patterns in individuals and societies. In: HUNT, J. H.; NALEPA, C. A. (Ed.). **Nourishment & evolution in insect societies**. Boulder, Colorado: Westview Press. p. 245-278.
- WILSON, E. O.; CARPENTER, F. M.; BROWN Jr., W. L. 1967. The first Mesozoic ants, with the description of a new subfamily. **Psyche.** v. 74, p. 1B19.
- WILSON, E. O. 1971. **The insects societies**. Cambridge: Belknap Press. 548 p.
- WILSON, E. O.; TAYLOR, R. W. 1967. The ants of polynesia (Hymnoptera: Formicidae). **Pacific Insects Monograph.** n1 14. 109 pp.

ZYLBERBERG, L.; JEANTET, A.Y., DELAGE-DARCHEN, B. 1974. Particularités structures de l'intime cuticulaire des glandes post-pharyngiennes des formis. **J. Microscop.** v. 21, p. 331-342.