

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 14/03/2020.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

O papel das secreções das formigas-cortadeiras na defesa da colônia

Mayara Cristina Pereira

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Abril - 2019

O papel das secreções das formigas-cortadeiras na defesa da colônia

Mayara Cristina Pereira

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Rio Claro

2019

P436p	Pereira, Mayara Cristina O papel das secreções das formigas-cortadeiras na defesa da colônia / Mayara Cristina Pereira. -- Rio Claro, 2019 106 p. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientador: Odair Correa Bueno 1. Insetos. 2. Formiga-cortadeira. 3. Fungos patogênicos. 4. Antissépticos. I. Título.
-------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.

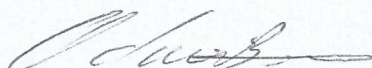
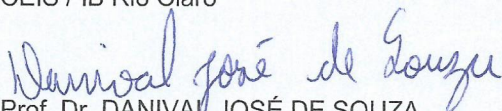
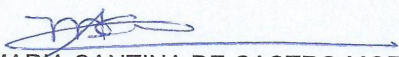
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: O PAPEL DAS SECREÇÕES DAS FORMIGAS-CORTADEIRAS NA DEFESA DA COLÔNIA

AUTORA: MAYARA CRISTINA PEREIRA

ORIENTADOR: ODAIR CORREA BUENO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO
CEIS / IB Rio Claro
Prof. Dr. DANIVAL JOSÉ DE SOUZA
Departamento de Engenharia Florestal / Universidade Federal do Tocantins
Profa. Dra. MARIA SANTINA DE CASTRO MORINI
Núcleo de Ciências Ambientais / Universidade de Mogi das Cruzes

Rio Claro, 14 de março de 2019

Dedico esse trabalho à minha avó Maria (in memoriam) que me ensinou a ter orgulho de quem eu sou e a respeitar os que cruzam meu caminho.

AGRADECIMENTOS

A trajetória dentro da universidade exige coragem, disciplina e persistência e as pessoas que encontramos nesse caminho fazem toda a diferença. Seja para nos dar um puxão de orelha no momento certo, para compartilhar as angústias daquele experimento que deu errado ou para bater papo sobre assuntos não acadêmicos. Fazem parte também os que nos fazem acreditar, com incentivo e amor, que somos capazes de desenvolver um bom trabalho. E é por isso que agradeço a cada um que esteve presente em minha vida nesses dois anos, com quem compartilhei os momentos desafiadores e felizes dessa pós-graduação. Sou grata a Deus, que me permitiu chegar até aqui. Ao meu orientador Prof. Dr. Odair pela confiança, apoio e pelas oportunidades de discutir ciência, seja no meu projeto ou fora dele. Aos amigos que conquistei no Centro de Estudo de Insetos Sociais que não só participaram de alguma forma da realização desse trabalho, como também me ofereceram incentivo profissional, momentos de descontração e parceria. Às meninas, Amanda, Daiane e Manuela, que acompanharam de perto o desenvolvimento desse projeto, contribuindo com conhecimento, carinho e estando sempre prontas para me ouvir. Às meninas, Thays, Bianca, Nathalia, Thaís e Syndell que tornaram nosso ambiente de trabalho agradável e descontraído, e sempre estiveram dispostas a ajudar. Às pessoas que fizeram parte do meu crescimento pessoal nesses dois anos e muito me ensinaram sobre as relações humanas, como a Ana Cláudia, o Alexsandro e a Silvana. À amigos especiais que ouviram sobre meus momentos de êxito, de dúvida, de desespero, como o Tiago, a Fernanda, o Denis, a Tábata, o Murilo, o Jonatas, dentre outros que estiveram ao meu lado e que têm um espaço enorme no meu coração. Aos meus pais, Delmina e Mario e aos meus irmãos, Margot e Mario, por todo apoio, dicas e pela confiança que sempre depositaram em mim, sem eles nada disso seria possível. À minha avó Maria (*in memoriam*) que é parte importante do que sou hoje e das coisas que acredito. Agradeço aos professores, funcionários e outros colegas de profissão que possibilitam o uso dos espaços da Unesp, lugar em que sempre me senti acolhida e aprendi muito. À licenciatura e todos os envolvidos que contribuíram para meu encanto pela biologia, a descoberta do “ser professor” e, que são espelhos que me ajudam a acreditar na educação. Àqueles que de coração torceram pela conclusão dessa pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Logo, a felicidade interior é concretamente o combustível do sucesso”

Dr. John Hagelin

RESUMO

Atualmente, a tribo Attini compreende 45 gêneros e entre eles estão as formigas-cortadeiras cultivadoras de fungo, pertencentes aos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, que causam grandes danos econômicos a agricultura devido ao intenso corte de materiais vegetais frescos para cultivo do seu fungo simbiótico *Leucogaricus gongylophorus*. Essas formigas apresentam diferentes mecanismos de defesa para proteger seus ninhos contra organismos competidores. Dentre esses mecanismos está a defesa humoral e celular (inata e adquirida) do sistema imune interno e a defesa imune externa, que inclui qualquer característica atuando no ambiente capaz de melhorar sua proteção contra patógenos, sendo esta caracterizada em formigas pela remoção física de patógenos e pela secreção de compostos antimicrobianos advindos de glândulas exócrinas e simbiontes bacterianos. Poucos estudos buscam integrar os diferentes fatores envolvidos na capacidade defensiva das formigas a fim de compreender estratégias fisiológicas adquiridas para proteger a colônia. Diante disso, a presente pesquisa teve por objetivo investigar a defesa da formiga-cortadeira *Atta sexdens* contra patógenos. Para tanto, realizamos a revisão sistemática dos mecanismos de defesa das formigas discutidos na literatura, a qual nos direcionou para investigação da defesa química externa dessa espécie de formiga. Os ensaios conduzidos foram de atividade enzimática, análise cromatográfica e testes de inibição de fungos patógenos e antagonistas. Verificamos que secreções, frequentemente depositadas no jardim de fungo, como a secreção da glândula mandibular e do líquido fecal, inibem a germinação de cinco espécies fúngicas. Os resultados evidenciam a presença de compostos, como o peróxido de hidrogênio e o ácido láctico, com capacidade antimicrobiana nessas secreções, as quais participam direta ou indiretamente da obtenção de um ambiente livre de patógenos e com pH controlado no ninho. A investigação de outros fatores, internos e externos, envolvidos nas estratégias defensivas das formigas-cortadeiras é necessária e poderá melhor esclarecer a capacidade de detecção e remoção de patógenos por esses insetos.

Palavras-chave: Attini, mecanismos de defesa, glândulas exócrinas, formigas cultivadoras de fungo.

ABSTRACT

Currently Attini tribe comprises 45 genera and among them are fungus-growing leaf-cutting ants belonging to the genera *Atta* and *Acromyrmex*. They cause great economic damage to agriculture due to the intense cutting of fresh plant material for cultivation of its symbiotic fungus *Leucogaricus gongylophorus*. These ants present different defense mechanisms to protect their nests against competing organisms. Among these mechanisms is the humoral and cellular defense (innate and acquired) of the internal immune system and the external immune defense. This last one includes any hereditary characteristic acting in the environment and being capable of improve its protection against pathogens. It is characterized in ants by the physical removal of pathogens and by secretion of antimicrobial compounds from exocrine glands and bacterial symbionts. Few studies have sought to integrate the different factors involved in ants' defensive capacity in order to understand physiological strategies acquired to protect the colony. In this way, the present research had the goal to investigate the defense of the ant-cutter *Atta sexdens* against pathogens. For this, we performed the systematic review of ant defense mechanisms discussed in the literature, which directed us to investigate the external chemical defense of this ant species. The tests carried out were of enzymatic activity, chromatographic analysis and tests of inhibition of pathogenic and antagonistic fungi. We have observed that secretions frequently deposited in the fungal garden, such as the secretion of the mandibular gland and fecal fluid, inhibit the germination of five fungal species. The results evidenced the presence of compounds as hydrogen peroxide and lactic acid, both with antimicrobial capacity. They participate directly or indirectly in obtaining a pathogen free environment with controlled pH in the nest. The investigation of other factors internal and external involved in the defensive strategies of leaf-cutting ants is necessary and may better clarify the pathogen detection and removal capacity of these insects.

Key words: Attini, defense mechanisms, exocrine glands, fungus-growing ants.

Lista de Figuras

Capítulo 1

- Figura 1 - Esquema representativo dos fatores que permeiam a defesa das colônias de formigas-cortadeiras..28
- Figura 2 - Distribuição temporal do número de artigos publicados em períodos de cinco anos nas diferentes categorias de “mecanismos de defesa das formigas”. IS: imunidade social; DE: defesa externa; DS: defesa mediada por simbioses; DI: defesa interna; O: outros; DQ: defesa química.....30
- Figura 3 - Distribuição percentual dos trabalhos agrupados por “mecanismo de defesa”.30
- Figura 4 - Distribuição percentual de artigos que encontraram diferentes respostas defensivas desencadeadas pelos mecanismos de defesa.....31
- Figura 5 - Distribuição percentual de artigos que utilizaram diferentes métodos de pesquisa.31
- Figura 6- Distribuição percentual de artigos em relação a subfamília e ao gênero de formiga que foi alvo de pesquisa.....32
- Figura 7 - Distribuição percentual de artigos em relação a espécie de microrganismo utilizada e sua classificação.....32
- Figura 8 - Temas encontrados na revisão sistemática que integram a defesa imunológica das formigas. Os modos de ação de cada mecanismo são apresentados em cinza.34
- Figura 9 – Distribuição percentual dos artigos relacionados à estudos com quatro diferentes glândulas de Formicidae.40

Capítulo 2

- Figura 1 - Picos selecionados para análise cromatográfica a partir do padrão de ácido láctico.67
- Figura 2 - Taxa de germinação dos esporos (%) das cinco espécies de fungos selecionadas para tratamento com secreção do líquido fecal (LF) e glândula mandibular (SGM) de *Atta sexdens*. Bb: *B. bassiana*; Tc: *T. harzianum*; Mt: *Metarhizium anisopliae*; Sc: *Syncephalastrum* sp.; Esc: *Escovopsis* sp.69
- Figura 3 - Curva de inibição da germinação de esporos de *B. bassiana* após tratamento com secreção do líquido fecal (LF) e glândula mandibular (SGM) de *Atta sexdens*. Eixo x: log dos valores de concentração das diluições; Eixo y: índice de germinação (IG).70
- Figura 4 - Imagens das placas de cultivos dos cinco fungos selecionados para tratamento com secreção do líquido fecal (LF, primeira diluição D1) e glândula mandibular (SGM, primeira diluição M1) de *Atta sexdens*. Bb: *B. bassiana*; Tc: *T. harzianum*; Mt: *Metarhizium*

anisopliae; Sc: *Syncephalastrum* sp.; Esc: *Escovopsis* sp. Circulado em vermelho: esporos não germinados; circulado em azul: esporos germinados; ponta da seta azul: esporos no início da germinação. A: 200x.71

Figura 5 - Curva padrão de peróxido de hidrogênio (0 a 40 µM) e dados das amostras de líquido fecal (LF) e secreção da glândula mandibular (SGM) de *Atta sexdens* (“Amplex Test”).73

Figura 6 - Curva padrão de peróxido de hidrogênio (0 a 2 mg/l) e dados das amostras de líquido fecal (LF) e secreção da glândula mandibular (M) de *Atta sexdens* (“Spectroquant Test”).74

Figura 7 - Cromatograma da amostra de líquido fecal que mostra a abundância relativa do ácido láctico no tempo de retenção 6,6 min (seta).75

Figura 8 - Cromatograma da amostra do fungo do formigueiro que mostra a abundância relativa do ácido láctico no tempo de retenção 6,6 min (seta).76

Figura 9 - Cromatograma da amostra do fungo da placa de cultura que mostra a abundância relativa do ácido láctico no tempo de retenção 6,6 min (seta).76

Capítulo 3

Figura 1 - Micrografia de esporos de *Beauveria bassiana* em início de germinação. Circulo vermelho: esporo não germinado; circulo verde: esporo germinado. A: 200x.....90

Figura 2 - Curva de inibição da germinação de esporos de *Beauveria bassiana* após tratamento com H₂O₂ em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: log dos valores de concentração..94

Figura 3 - Curva de inibição da germinação de esporos de *Metarhizium anisopliae* após tratamento com H₂O₂ em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: log dos valores de concentração.94

Figura 4 - Curva de inibição da germinação de esporos de *Trichoderma harzianum* após tratamento com H₂O₂ em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: log dos valores de concentração.95

Figura 5 - Curva de inibição da germinação de esporos de *Escovopsis* sp. após tratamento com H₂O₂ em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: log dos valores de concentração95

Figura 6 - Curva de inibição da germinação de esporos de *Syncephalastrum* sp. *anisopliae* após tratamento com H₂O₂ em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: log dos valores de concentração.96

Figura 7 - Fotografias obtidas das placas de cultivo dos cinco fungos tratados com H ₂ O ₂ em diferentes concentrações. Bb: <i>Beauveria bassiana</i> ; Tc: <i>Trichoderma harzianum</i> ; Mt: <i>Metarhizium anisopliae</i> ; Sc: <i>Syncephalastrum</i> sp.; Esc: <i>Escovopsis</i> sp. C: controle. A: 200x..	97
Figura 8 - Curva de inibição da germinação de esporos de <i>Beauveria bassiana</i> após tratamento com ácido láctico (AL) em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: log dos valores de concentração.....	98
Figura 9 - Fotografias dos esporos de <i>Beauveria bassiana</i> em placas de cultivo após tratamento com diferentes concentrações de ácido láctico (AL). C: controle. A: 200x.....	98
Figura 10 - Fotografias dos esporos de <i>Beauveria bassiana</i> em placas de cultivo após tratamento com diferentes concentrações de tampão lactato de sódio pH 4 (TL). C: controle. A: 200x..	99
Figura 11 - Curva de inibição da germinação de esporos de <i>Beauveria bassiana</i> após tratamento com tampão lactato de sódio pH 4 (TL) em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: log dos valores de concentração.	99
Figura 12 - Fotografias dos esporos de <i>Beauveria bassiana</i> em placas de cultivo após tratamento com diferentes concentrações de tampão lactato de sódio pH 4 com peróxido de hidrogênio (TL+H ₂ O ₂). C: controle. A: 200x.....	100
Figura 13 - Curva de inibição da germinação de esporos de <i>Beauveria bassiana</i> após tratamento com TL+H ₂ O ₂ em diferentes concentrações.. IG: índice de germinação. Eixo x: log dos valores de concentração.	100
Figura 14 - Fotografias dos esporos de <i>Beauveria bassiana</i> em placas de cultivo após tratamento com três concentrações de tiosulfato sódio (TS), peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e a misturas dos dois compostos (TS+H ₂ O ₂). C: controle. A: 200x.....	101
Figura 15 - Curva de inibição da germinação de esporos de <i>Beauveria bassiana</i> após tratamento com TS+H ₂ O ₂ em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: log dos valores de concentração.	102

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1 - Tópicos pré-estabelecidos para agrupamento dos trabalhos científicos.	29
---	----

Capítulo 2

Tabela 1 - Parâmetros de temperatura definidos no cromatógrafo a gás.	67
--	----

Tabela 2 - Índice de germinação (IG) dos cinco fungos selecionados. C: grupo controle; LF: suspensão de esporos preparada com líquido fecal; SGM: suspensão de esporos preparada com secreção da glândula mandibular;; D1 – “in natura”, D2 – diluição 50% de D1e D3 – diluição 50% de D2.....	70
--	----

Tabela 3 - Dados dos testes colorimétricos para quantificação de peróxido e pH das amostras de líquido fecal (LF) e glândula mandibular (SGM) de <i>Atta sexdens</i> e amostras do fungo <i>L. gongylophorus</i> do jardim de fungo (FF) e cultivado em meio de cultura (FP).	72
--	----

Tabela 4 - Dados dos testes colorimétricos para quantificação de peróxido e pH no jardim de fungo (FF) de <i>Atta sexdens</i> após contaminação com <i>Escovopsis</i> sp. e iscas tóxicas.	72
---	----

Tabela 5 - Valores de absorbância e concentração de peróxido de hidrogênio nas amostras de líquido fecal (LF) e secreção da glândula mandibular (SGM) de <i>Atta sexdens</i> (Amplex Test).	74
--	----

Tabela 6 - Valores de absorbância e concentração de peróxido de hidrogênio nas amostras de líquido fecal (LF) e secreção da glândula mandibular (SGM) de <i>Atta sexdens</i> (Spectroquant Test).	75
--	----

Capítulo 3

Tabela 1 - Tempo de início de germinação (TG) dos esporos utilizados nos ensaios de inibição.....	92
---	----

Tabela 2 - Valores de logEC50 obtidos da análise de regressão realizada com os dados dos testes de inibição de cinco espécies fúngicas. Concentração (mM) de H2O2 correspondente ao log..	93
--	----

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Referencial teórico	15
3. Objetivo geral.....	17
4. Apresentação.....	17
Capítulo 1	
1. Introdução	25
2. Objetivo.....	27
3. Material e métodos.....	27
4. Resultados e Discussão	28
4.1. Imunidade social	34
4.2. Defesa imune externa (glândulas exócrinas).....	37
4.3. Defesa mediada por simbioses	40
4.4. Defesa imune interna.....	43
4.5. Ambiente do ninho.....	45
4.6. Outros mecanismos	47
5. Considerações finais	48
Capítulo 2	
1. Introdução	60
2. Objetivos	61
3. Material e métodos.....	62
3.1. Coleta da espécie.....	62
3.2. Teste de inibição de fungos.....	62
3.3. Análise da presença de peróxido de hidrogênio.....	63
3.3.1. Teste colorimétrico.....	64
3.3.2. “Kits” de análise enzimática	65
3.4. Análise da presença de ácido lático	66
3.4.1. Derivatização por BSTFA.....	66
3.4.2. Análise de dados	68
4. Resultados	68
4.1. Testes de inibição de fungos	68
4.2. Análise da presença de peróxido de hidrogênio.....	71
4.2.1. Teste Colorimétrico.....	71
4.2.2. Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit.....	73
4.2.3. Spectroquant® Hydrogen Peroxide Test.....	74
4.3. Análise da presença de ácido lático	75
5. Discussão	77

6. Conclusão.....	80
-------------------	----

Capítulo 3

1. Introdução	87
2. Objetivos	88
3. Material e métodos	89
3.1. Germinação dos esporos fúngicos.....	89
3.2. Inibição da germinação de fungos.....	90
4. Resultados	92
4.1. Germinação dos esporos fúngicos.....	92
4.2. Inibição da germinação de fungos com peróxido de hidrogênio.....	93
4.3. Inibição da germinação de fungos com ácido lático	97
4.4. Inibição da germinação de fungos com outros compostos.....	98
4.4.1. Tampão lactato de sódio.....	98
4.4.2. Tiosulfato de sódio	100
5. Discussão	102
6. Conclusão.....	105

1. Introdução

A sistemática dos Formicidae atualmente contém 20 subfamílias de formigas existentes (BOLTON AntCat, 2018) quatro delas, Dolichoderinae, Formicinae, Myrmicinae e Ponerinae, correspondem a quase 90% de todas as espécies conhecidas. Myrmicinae é a de maior diversidade, com aproximadamente 6.694 espécies existentes (BOLTON AntCat, 2018). Até 2014 Myrmicinae totalizava 25 tribos; porém, com base em análises filogenéticas de 11 genes nucleares, incluindo dois genes ribossomal, 18S rDNA e 28S rDNA, e nove genes codificadores de proteínas, o número de tribos foi reduzido para apenas seis. A maior delas é a Tribo Attini, que compreende 45 gêneros. Entre eles, estão os 17 gêneros (Subtribo Attina) com as espécies de formigas cultivadoras de fungo (WARD et al., 2014; WARD AntWeb, 2018).

As formigas cultivadoras de fungo cultivam em seus ninhos o fungo mutualista, que é base alimentar das colônias. Essas formigas coletam diversos materiais vegetais frescos que são o substrato para o crescimento do fungo. Para isso elas adquiriram, ao longo do processo evolutivo, comportamentos de preparação do substrato que têm como função inicial a decomposição e incorporação do material (HOLLOBLER; WILSON, 1990; MUELLER et al., 2001). Dessa forma, elas saem em forrageio, coletam materiais vegetais e, com uso das peças bucais, preparam uma polpa macerada a ser incorporada no jardim de fungo (SCHULTZ, 1999; DINIZ; BUENO, 2009; DINIZ; BUENO, 2010).

As formigas-cortadeiras, pertencentes a dois gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, são consideradas herbívoros dominantes na Região Neotropical e desempenham um papel importante em termos de diversidade, ciclagem de nutrientes e fluxo de energia (HOLLOBLER; WILSON, 1990; PERFECT; VANDERMEER, 1993). A construção dos ninhos e atividades de forrageamento modificam as propriedades do solo, melhorando a penetração de raízes, aeração, drenagem e aumentando a disponibilidade de matéria orgânica e mineralização de nutrientes (DELLA LUCIA, 2014). Esses são insetos altamente sociais por apresentarem castas reprodutivas e estéreis, sobreposição de gerações, divisão de trabalho e cuidado com a prole (WILSON, 1971).

Grande parte das Attini cultivadoras de fungo apresenta uma relação simbiótica com fungos do gênero *Leucoagaricus* (Agaricaceae: Leucocoprinae). Em geral, a fêmea reprodutora, ao sair do ninho para realizar o voo nupcial e fundar uma nova colônia carrega pequeno fragmento do fungo simbiote em sua cavidade infra bucal (MARICONI, 1970; HÖLLOBLER; WILSON, 1990) e, após cavar o local do ninho, regurgita-o iniciando o

cultivo. A espécie *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758), que cultiva em seu jardim o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, apresenta operárias polimórficas, mínimas, médias e grandes, que vivem em colônias com uma população que pode chegar a milhões de indivíduos. As castas desempenham diferentes funções no ninho, sendo as operárias mínimas responsáveis pela manutenção do jardim de fungo, as médias pela coleta de material vegetal (forrageio) e as grandes são chamadas “soldados”, responsáveis pela defesa contra predadores (WILSON, 1980; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; MUELLER, 2002).

Nessa relação simbiótica, as formigas fornecem ambiente úmido e substrato vegetal para o desenvolvimento do fungo, que serve como fonte de alimento para as larvas, além de ser parte da alimentação dos adultos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; MUELLER, 2002). Além disso, as formigas são beneficiadas pela quebra de enzimas que possibilita a detoxificação de compostos secundários provenientes dos vegetais, que poderiam atuar como inseticidas (LITTLEDYKE; CHERRETT, 1978; NORTH et al., 1997; NORTH et al., 1999) e o fungo se beneficia pelo ambiente livre de competidores, já que as formigas produzem compostos antibióticos e sanitarizam o ninho (CURRIE; STUART, 2001).

A intensa atividade de corte de materiais vegetais as caracterizam como pragas agrícolas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Estimativas globais das perdas econômicas causadas pelas formigas-cortadeiras podem alcançar bilhões de dólares (MONTROYA-LERMA et al., 2012). Atualmente, o principal método de controle das formigas-cortadeiras é o químico, amplamente utilizado na formulação de iscas tóxicas ou por nebulização, e o único a apresentar resultados eficazes. Porém, alguns inseticidas foram proibidos em alguns países da América Latina por causa de sua toxicidade não-seletiva (MONTROYA-LERMA et al., 2012; DELLA LUCIA, 2014; SILVA, 2006; NOGUEIRA-NETO, 1997). Assim, diversos estudos buscam métodos alternativos de controle capazes de minimizar os prejuízos causados pelas formigas-cortadeiras, dentre eles estão o controle mecânico, controle biológico e controle químico com compostos menos agressivos ao ambiente (BOARETTO; FORTI, 1997; DELLA-LUCIA, 2014; BRITTO et al., 2016).

As opções de controle biológico sugeridas atualmente estão relacionadas ao uso de microrganismos entomopatogênicos, extratos de plantas e a combinação de plantas com agentes patogênicos para formulação de iscas tóxicas que ocasionam toxicidade às operárias ou ao fungo simbiote, com menor impacto ambiental do que os produtos químicos, como inseticidas (ALMEIDA et al., 2007; BRITTO et al., 2016). Embora o controle biológico tenha mostrado resultados promissores, ainda não é eficaz no campo e necessita de melhorias na atratividade das iscas e no estudo dos diferentes fungos antagonistas. A limitação mais

importante do controle biológico é a capacidade das formigas-cortadeiras de detectar e se recuperar contra agentes patogênicos em condições naturais (BOARETTO e FORTI, 1997; MONTOYA-LERMA et al., 2012; BRITTO et al., 2016).

Poucos estudos relacionam os fatores envolvidos na capacidade defensiva das formigas-cortadeiras. A investigação dos mecanismos de defesa, tais como o comportamento social e a presença de endossimbiontes, se torna relevante já que possibilita esclarecer a capacidade de detecção e remoção de patógenos pelas operárias. Pesquisas basais que abordam esse tema revelam características fisiológicas das formigas-cortadeiras e podem contribuir para repensar os métodos de controle utilizados atualmente.

2. Referencial teórico

Os insetos em geral apresentam diferentes mecanismos de defesa contra parasitas e são capazes de detectar e reagir a diferentes patógenos que ameaçam o organismo hospedeiro. Dentre os mecanismos, a defesa humoral e celular do sistema imunológico interno responde com diferentes efetores para erradicar ou incapacitar uma diversidade de agentes nocivos, como vírus, bactérias ou fungos (HOFFMANN, et al., 1996). Quando infectados, os insetos aumentam a quantidade de células imunes (hemócitos) que fazem fagocitose e encapsulação e aumentam secreções antibacterianas (CHOUVENC et al., 2009; ROSENGAUS et al., 2011). As substâncias químicas externalizadas estão presentes em diferentes grupos animais e funcionam como antimicrobianos, definidos como compostos autoproduzidos, derivados de simbiontes, glândulas ou do ambiente que são utilizados contra microrganismos. Em insetos, a secreção de antimicrobianos tem como propósito proteger o ninho e o alimento estocado (OTTI et al., 2014).

Além dos mecanismos de imunidade interna, o termo “defesa imune externa”, proposto por Otti et al. (2014), integra o sistema imune dos insetos e inclui qualquer característica hereditária atuando no ambiente capaz de melhorar sua proteção contra patógenos, ou mesmo, manipular a composição da comunidade microbiana a seu favor. Uma característica hereditária, por exemplo, é que os insetos sociais podem modular seus comportamentos e respostas imunes quando há presença de patógenos e, consequentemente, transferem essa imunidade entre os indivíduos. Um estudo realizado com cupins expostos a altas doses de conídios fúngicos revelou que os indivíduos contaminados transmitem sinais vibratórios de alarme através do substrato e os demais fogem em resposta, reduzindo assim a contaminação do grupo (ROSENGAUS et al., 1999; ROSENGAUS et al., 2011).

Outras adaptações comportamentais, como o comportamento de limpeza em formigas e cupins, participam na disseminação de secreções antimicrobianas, reduzindo o risco de infecção do ninho e também podem ser consideradas estratégias da defesa imune externa (OTTI et al., 2014). O surgimento de tais estratégias depende do nicho ecológico e da história evolutiva do organismo, de forma que o aumento do uso de defesa imune externa está associado ao aumento da pressão parasitária e uma baixa variação espacial e temporal no ambiente microbiano de um organismo (TRAGUST, 2016). A defesa imune externa está relacionada à fisiologia e sistema imunológico interno de um organismo. Como dito, os componentes desta defesa podem ser secreções antimicrobianas (OTTI et al., 2014).

As fontes primárias de compostos antimicrobianos são secreções de glândulas exócrinas e de microrganismos simbioses, como bactérias actinomicetos (FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2009). As formigas fazem uso de secreções produzidas em glândulas exócrinas na comunicação dos indivíduos da colônia como parte da organização social, por exemplo, feromônios de trilha, de alarme e marcação territorial. Além disso, uma variedade de glândulas exócrinas produz compostos antimicrobianos (MORGAN, 2008). As glândulas mandibulares, que fazem parte do sistema salivar das formigas, são estruturas ligadas às mandíbulas (GAMA; CRUZ-LANDIM, 1982) e seus compostos são frequentemente identificados como feromônios de alarme (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Em *Calomyrmex* sp., a secreção da glândula mandibular apresentou atividade antimicrobiana quando testada contra microrganismos isolados do solo (bactérias e fungos) (BROUGH, 1983).

As secreções das glândulas de veneno e metapleurais de diferentes espécies de formigas apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* (TRAGUST, 2016). Ambas sintetizam secreções que possuem variada função biológica. Os venenos produzidos pelas glândulas de veneno de alguns gêneros de formigas são utilizados como compostos defensivos injetáveis ou agentes tóxicos para captura de presas, além de agirem como feromônios de reconhecimento, rastreamento e alarme (SCHIMIDT, 1986). Geralmente, apresentam em sua composição proteínas e peptídeos, podendo em algumas espécies apresentar moléculas pequenas contendo nitrogênio (MORGAN, 2008). Já a secreção da glândula metapleural é utilizada para reconhecimento de colônia, espécie ou marcação de território e também como defesa química contra patógenos (YEK; MUELLER, 2011).

Destacando-se a glândula metapleural, as suas secreções em formigas da subtribo Attina são capazes de suprimir a germinação de conídios e aumentar a sobrevivência de operárias contaminadas (FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2009; POULSEN et al., 2002). Os

compostos encontrados na secreção desta glândula impedem a germinação de esporos fúngicos e agem como antibiótico protegendo o organismo de agentes patogênicos (MORGAN, 2008). Essa glândula apresenta também diferenças morfofisiológicas em espécies basais e derivadas de formigas-cortadeiras, sendo que as derivadas apresentam glândulas mais desenvolvidas, provavelmente pela pressão parasitária sofrida por essas espécies (VIEIRA et al., 2012)

Além do uso das defesas imunes externas, o termo “imunidade social”, explanado por Cremer et al. (2007) e Cotter; Kilner (2010), diz respeito a defesas imunológicas cooperativas baseadas em adaptações organizacionais em insetos sociais, em que serviços imunitários são compartilhados entre os membros do grupo em benefício da colônia.

Um exemplo disso é a imunização ativa da colônia da espécie *Lasius neglectus* Van Loon et al., 1990, em que operárias quando submetidas a doses letais de *Metarhizium anisopliae* caminham em suas colônias expondo outras operárias a doses fúngicas não-letais, mas que são suficientes para induzir um padrão específico de expressão do gene imunológico antifúngico. Esses indivíduos se tornam mais resistentes quando expostos, posteriormente, a dose letal do mesmo patógeno. Dessa forma, um inseto social pode aumentar sua resposta imune quando há a exposição secundária a um patógeno. E além da sobrevivência do hospedeiro, as respostas imunes afetam a sobrevivência e a transmissão de doenças dentro da colônia (KONRAD et al., 2012; BABAYAN; SCHNEIDER, 2012).

Também envolvido nos mecanismos de defesa das formigas-cortadeiras podemos citar a presença de endo e ectossimbiontes, que têm desempenhado um importante papel na evolução das formigas (RUSSEL et al., 2009). Os simbiotes contribuem com a aquisição de nutrientes e suplementação de vitaminas. Os insetos eussociais estão amplamente relacionados à simbiotes bacterianos que vivem em seu interior. Geralmente, as simbioses entre insetos e comunidade microbiana são evolutivamente antigas, de modo que a relação complementar entre hospedeiros e simbiotes tem evoluído ao longo do tempo e desencadeado benefícios para ambos (SAPOUNTZIS et al., 2015).

As formigas cultivadoras de fungos apresentam uma das mais complexas simbioses microbianas porque ambos (formiga-fungo) possuem uma rica comunidade de microrganismos associados, os quais têm funções nutricionais (KELLNER et al., 2015). Alguns simbiotes bacterianos encontrados nas formigas cultivadoras de fungos são responsáveis pela produção de antibióticos contra uma diversidade de patógenos (SEN et al., 2009). Muitas das bactérias das formigas são encontradas em seu trato digestório, que é habitado por uma gama de microrganismos, mas podem também colonizar sua cutícula. A

composição dessa comunidade bacteriana varia entre os táxons de formigas, seus níveis tróficos e diferentes órgãos, além de existirem fatores fisiológicos e ambientais que influenciam na colonização bacteriana (RUSSELL et al., 2009; VIEIRA et al., 2017).

3. Objetivo geral

Tendo em vista a capacidade das formigas-cortadeiras de reconhecer e se recuperar da contaminação por patógenos, o presente trabalho teve por objetivo investigar a defesa da colônia de *Atta sexdens* Linnaeus, 1758, a fim de integrar os diferentes fatores envolvidos em suas respostas defensivas. Em particular buscou-se enfatizar o papel das secreções da glândula mandibular e do líquido fecal em atuar na defesa química dessa espécie.

Objetivos específicos

1- Verificar, a partir de uma revisão sistemática, o que se têm produzido no campo da pesquisa científica quanto aos diferentes mecanismos de defesa das formigas, como defesa imune interna, secreção glandular e a participação de simbiontes bacterianos. De maneira a estabelecer um panorama do que é conhecido na comunidade científica.

2- Analisar quimicamente as secreções do líquido fecal e da secreção da glândula mandibular de *Atta sexdens*, a fim de verificar se essas colaboram para o estabelecimento de um microambiente peculiar no interior dos ninhos que favorece a estabilidade imunológica das colônias.

3- Avaliar se componentes desse microambiente no interior dos ninhos são capazes de inibir *in vitro* o crescimento de fungos patogênicos e antagonistas do fungo mutualista.

4. Apresentação

O tema e os objetivos desta pesquisa, que estão relacionados a investigação dos mecanismos de defesa imune das formigas, serão apresentados em dois capítulos, contendo introdução, objetivos, metodologia utilizada e os resultados encontrados. O Capítulo 1 compreende os resultados do primeiro objetivo, trata de uma revisão sistemática que constrói um panorama acerca dos mecanismos de defesa e respostas defensivas de formigas de várias espécies. O Capítulo 2 apresenta os resultados experimentais que atendem ao segundo e terceiro objetivos, portanto, trata da análise química e microbiológica das secreções do líquido fecal e da glândula mandibular da formiga-cortadeira *A. sexdens*, testadas contra fungos patogênicos e antagonistas do fungo mutualista.

Referências

- ALMEIDA, R.N.A.; PENÃFLOR, M.F.G.V.; SIMOTE, S.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; da SILVA, M.F.G.F. Toxicity of substances isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the leafcutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *BioAssay*. v. 2, p. 1–8, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14295/BA.v2.0.53>
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas-cortadeiras. *Série Técnica IPEF*, Botucatu, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.
- BABAYAN, S. A.; SCHNEIDER, D. S. Immunity in society: diverse solutions to common problems. *PLoS Biology*, v. 10, n. 4, p. e1001297, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001297>.
- BOLTON, B. (2018). An online catalog of the ants of the world. Disponível em: <http://antcat.org>. Acesso 26 de maio de 2018
- BRITTO, J.S.; FORTI, L.C.; OLIVEIRA, M.A.; ZANETTI, R.; WILCKEN, C.F.; ZANUNCIO, J. C.; LOECK, A.E. et al. Use of Alternatives to PFOS, Its Salts and PFOSF for the Control of Leaf-Cutting Ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Intern. Journal of Reserch in Environ. Studies* n. 3, p. 11–92, 2016.
- BROUGH, E. J. The antimicrobial activity of the mandibular gland secretion of a formicine ant, *Calomyrmex* sp. (Hymenoptera: Formicidae). *J. of Invertebrate Pathol.*, v. 42, n. 3, p. 306-311, 1983. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(83\)90168-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(83)90168-4).
- CHOUVENC, T.; SU, N.Y.; ROBERT, A. Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. of Insect Physiol.*, v. 101, n. 3, p. 234–241, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.05.008>
- COTTER, S. C.; KILNER, R. M. Personal immunity versus social immunity. *Behav. Ecol.*, v. 21, n. 4, p. 663-668, 2010.
- CREMER, S.; ARMITAGE, S. A. O.; SCHMID-HEMPEL, P. Social immunity. *Curr. Biol.*, v. 17, p. R693–R702, 2007. Disponível em: <https://doi.org/doi:10.1016/i.cub.2007.06.008>.
- CURRIE, C.R.; STUART, A.E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *The Royal Society*. v. 268, n. 1471, p.1033-1039, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2001.1605>.
- DELLA LUCIA, T.M.C; GANDRAB L.C.; GUEDES, R.N.C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Management*, v. 70, n.1, p. 14–23, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3660>.
- DINIZ, E.A.; BUENO, O.C. Substrate Preparation Behaviors for the Cultivation of the Symbiotic Fungus in Leaf-Cutting Ants of the Genus *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. v. 53, n. 2, p. 1–16, 2009.

- DINIZ, E.A.; BUENO, O.C. Evolution of Substrate Preparation Behaviors for Cultivation of Symbiotic Fungus in Attine Ants (Hymenoptera: Formicidae). *J Insect Behav.* v. 23, p. 205–214, 2010.
- FERNÁNDEZ-MARÍN, H., ZIMMERMAN, J. K., NASH, D. R., BOOMSMA, J. J., & WCISLO, W. T. (2009). Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming in ants. *Proc. Biol. Sci.*, v. 276, p. 2263–2269, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2009.0184>.
- GAMA, V.; DA CRUZ LANDIM, C. Estudo comparativo das glândulas do sistema salivar de formigas (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, v. 7, p. 145-165, 1982.
- HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M.; HETRU, C. Innate immunity in higher insects. *Curr. Opinion in Immunology*, v. 8, n. 1, p. 8–13, 1996. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0952-7915\(96\)80098-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0952-7915(96)80098-7).
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. *The ants*. Berlin: Springer-Verlag, 1990. 732p.
- KELLNER, K.; ISHAK, H. D.; LINKSVAYER, T. A.; MUELLER, U. G. Bacterial community composition and diversity in an ancestral ant fungus symbiosis. *FEMS microbiology ecology*, v. 91, n. 7, p. 73, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv073>.
- KONRAD, M.; VYLETA, M.L.; THEIS, F.J.; STOCK, M.; TRAGUST, S.; KLATTI, M.; DRESCHER, V.; MARR, C.; UGELVIG, L.V.; CREMER, S. Social transfer of pathogenic fungus promotes active immunization in ant colonies. *PLoS Biol*, v. 10, n. 4, p. e1001300, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001300>
- LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. M. Defense mechanisms in young and old leaves against cutting by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae). *B. of Entomol. Research*, v. 68, n. 2, p. 263-270, 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007485300007343>.
- MARICONI, F. A. M. As saúvas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970. p. 167.
- MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M.; PICANÇO, M. C. Fatores que dificultam o controle das formigas cortadeiras. *Revista Bahia Agrícola*. v. 7, n. 2, p.18–21, 2006.
- MONTOYA-LERMA J.; GIRALDO-ECHEVERRI C.; ARMBRECHT I.; FARJI-BRENER A.; CALLE, Z. Leaf-cutting ants revisited: towards rational management and control. *Int J Pest Management*, v. 53, n. 3, p. 225–247., 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/09670874.2012.663946>.
- MORGAN, D.E. Chemical sorcery for sociality: exocrine secretions of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol. News*, v. 11, p. 79-90, 2008.
- MUELLER, U.G.; SCHULTZ, T.R.; CURRIE, C.R.; ADAMS, R. M.; MALLOCH, D. The origin of the attini ant-fungus mutualism. *Q. R. Biology*, v. 76, n. 2, p. 169–197, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1086/393867>.

- MUELLER, U. G. Ant versus fungus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attini ant-fungus symbiosis. *The American Naturalist*, v. 160, n. S4, p. 67-98, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1086/342084>.
- NOGUEIRA-NETO, P. *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. São Paulo: Nogueirapis, 1997, p. 33 -38.
- NORTH, R. D.; JACKSON, C. W.; HOWSE, P. E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. *Trends in Ecol. & Evol.*, v.12, n.10, p.386-389, 1997. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)87381-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(97)87381-8).
- NORTH, R.D.; JACKSON, C.W.; HOWSE, P.E. Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate for the fungus. *Physiol. Entomology*, Oxford, v. 24, n. 2, p. 127-133, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3032.1999.00122.x>.
- OTTI, O.; TRAGUST, S.; FELDHAAR, H. Unifying external and internal immune defences. *Trends in Ecol. & Evol.* v. 29, n. 11, p.625-634, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.09.002>.
- PERFECT, I.; VANDERMEER, J. Distribution and turnover rate of a population of *Atta cephalotes* in a tropical rain forest in Costa Rica. *Biotropica*, v. 25, n. 3, p. 316-321, 1993. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2307/2388789>.
- POULSEN, M.; BOT, A.N.M.; NIELSEN, M.G.; BOOMSMA, J.J. Experimental evidence for the cost and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf cutting ants. *Behav. Ecol. and Sociobiol.* v. 52, n. 2, p. 151–157, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00265-002-0489-8>
- ROSENGAUS, R.B.; JORDAN, C.; LEFEBVRE, M.L.; TRANIELLO, J.F. Pathogen alarm behavior in a termite: A new form of communication in social insects. *The Sci. of Nature*. 86, n. 11, p. 544–548, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s001140050672>
- ROSENGAUS, R.B.; TRANIELLO, J.F.A.; BULMER, M.S. Ecology, behavior and evolution of disease resistance in termites. In: Bignell DE, Roisin Y. *Biology of termites: a modern synthesis*. Berlin: Springer-Verlag, 2011, p. 165–192.
- RUSSELL, J.A.; MOREAU, C.S.; GOLDMAN-HUERTAS, B.; FUJIWARA, M.; LOHMAN, D.J.; PIERCE, N.E. Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci.*, v. 106, n. 50, p. 21236–21241, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0907926106>.
- SAPOUNTZIS, P.; ZHUKOVA, M.; HANSEN, L.H.; SORENSEN, S.J.; SCHIOTT, M.; AND BOOMSMA, J.J. *Acromyrmex* leafcutting ants have simple gut microbiota with nitrogen-fixing potential. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, n. 16, p. 5527–5537, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00961-15>

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

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

SEN, R.; ISHAK, H.; ESTRADA, D.; DOWD, S. E.; HONG, E.; MUELLER, U. G. Generalized antifungal activity and screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. *National Academy of Sciences*, v. 9, n. 106, p. 17805-17810, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0904827106>

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

TRAGUST, S. External immune defence in ant societies (Hymenoptera: Formicidae): the role of antimicrobial venom and metapleural gland secretion. *Myrmecological news*, v. 23, p. 119-128, 2016.

VIEIRA, A.S.; BUENO, O.C.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphophysiological differences between the metapleural glands of fungus-growing and non-fungusgrowing ants (Hymenoptera, Formicidae). *PLoS one*, v. 7, n. 8, p. e43570, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043570>.

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

WARD, P. S., editor (2013). *AntWeb: Ants of California*. Disponível em: <http://www.AntWeb.org/california.jsp>. Acesso em 26 outubro 2018.

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

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

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: *Atta*). I: The overall pattern in *A. sexdens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. v. 7, p. 143-156, 1980.

YEK, S.H. & MUELLER, U.G. The metapleural gland of ants. *Biological Reviews*, v. 86, n. 4, p. 774–791, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00170.x>.

6. Conclusão

Os resultados obtidos indicam que o peróxido de hidrogênio e o ácido láctico, compostos presentes nas secreções da formiga-cortadeira *Atta sexdens*, apresentam ação antimicrobiana, especificamente contra fungos entomopatogênicos e antagonistas do fungo mutualista, frequentemente encontrados no interior dos ninhos dessa espécie de formiga. O peróxido de hidrogênio na concentração de 50mM inibiu totalmente a germinação de cinco espécies fúngicas e quando na presença do tampão lactato de sódio foi ainda mais eficiente, inibindo quase que totalmente a germinação na concentração 5mM.

É possível que outros compostos presentes na secreção da glândula mandibular e no líquido fecal de *A. sexdens* apresentem atividade antimicrobiana, mas os ensaios microbiológicos conduzidos nesta pesquisa demonstram que o peróxido de hidrogênio e o ácido láctico têm importante participação na inativação de fungos entomopatogênicos e antagonistas do mutualista, durante os processos de assepsia do ninho. Outros estudos são necessários para traçar a rota metabólica desses compostos e seu modo de ação na defesa

imune externa e ainda, a imunidade social, ou seja, interações com outros organismos tanto dos ectossimbiontes como da endossimbiontes.

Referências

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1054p.
- BARBOSA, F. F. H., LIMA BARBOSA, L. P. J., BAMBIRRA, L. H. S., ABURJAILE, F. F. Produção de substâncias envolvidas no fenômeno de antagonismo bacteriano. *Rev. Biol. Cienc. da Terra*, v. 11, n. 1, 2011.
- BOS, N.; SUNDSTRÖM, L.; FUCHS, S.; FREITAK, D. Ants medicate to fight disease. *Evolution*, v. 69, n. 11, p. 2979-2984, 2015.
- BRITTO, J.S.; FORTI, L.C.; OLIVEIRA, M.A.; ZANETTI, R.; WILCKEN, C.F.; ZANUNCIO, J. C.; LOECK, A.E. et al. Use of Alternatives to PFOS, Its Salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Int. J. Environ. Stud.* n. 3, p. 11–92, 2016.
- CHEN, S.; SCHOPFER, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase. *Eur. J. Biochem.* , v. 260, n. 3, p. 726-735, 1999.
- CREMER, S.; ARMITAGE, S. A. O.; SCHMID-HEMPEL, P. Social immunity. *Curr. Biol.*, v. 17, p. R693–R702, 2007.
- DELLA LUCIA, T.M.C; GANDRAB L.C.; GUEDES, R.N.C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Manage.*, v. 70, n.1, p. 14–23, 2014.
- GUTTERIDGE, John MC; HALLIWELL, Barry. 1 Iron toxicity and oxygen radicals. *Bailliere's clinical haematology*, v. 2, n. 2, p. 195-256, 1989.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. *The ants*. Berlin: Springer-Verlag, 1990. 732p.
- HU, J.; LIN, Y.; ZHANG, Z.; XIANG, T.; MEI, Y.; ZHAO, S; PENG, N. High-titer lactic acid production by *Lactobacillus pentosus* FL0421 from corn stover using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource technology*, v. 214, p. 74-80, 2016.
- KONRAD, M.; VYLETA, M.L.; THEIS, F.J.; STOCK, M.; TRAGUST, S.; KLATTI, M.; DRESCHER, V.; MARR, C.; UGELVIG, L.V.; CREMER, S. Social transfer of pathogenic fungus promotes active immunisation in ant colonies. *PLoS Biol.*, v. 10, n. 4, p. e1001300, 2012.
- MARSARO, A.L.JR.; DELLA LUCIA, T.M.C.; BARBOSA, L.C.A.; MAFFIA, L.A., MORANDI, M.A.B. Efeito de secreções da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* Pers. *Fr. Neotropical Entomol.*, v. 30, n. 3, p. 403-406, 2001.

- MONTOYA-LERMA J.; GIRALDO-ECHEVERRI C.; ARMBRECHT I.; FARJI-BRENER A.; CALLE, Z. Leaf-cutting ants revisited: towards rational management and control. *Pest Manage.*, v. 53, n. 3, p. 225–247., 2012.
- MUELLER, U.G.; SCHULTZ, T.R.; CURRIE, C.R.; ADAMS, R. M.; MALLOCH, D. The origin of the attini ant-fungus mutualism. *Q. R. Biol.*, v. 76, n. 2, p. 169–197, 2001.
- NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 26, n.3, p. 171-177, 2001.
- NEAL, A. L., WEINSTOCK, J. O., & LAMPEN, J. O. Mechanisms of fatty acid toxicity for yeast. *J. Bacteriol.*, v. 90, n. 1, p. 126-131, 1965.
- OTTI, O.; TRAGUST, S.; FELDHAAR, H. Unifying external and internal immune defences. *Trends Ecol. Evol.* v. 29, n. 11, p.625-634, 2014.
- PIARD, J. C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le lait*, v. 71, n. 5, p. 525-541, 1991.
- RAMALHO, M. O.; BUENO, O. C.; MOREAU, C. S. Microbial composition of spiny ants (Hymenoptera: Formicidae: *Polyrhachis*) across their geographic range. *BMC Evolut. Biol.*, v. 17, n. 1, p. 96, 2017.
- RODRIGUES, A.; CARLETTI, C. D.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. *Braz. J. Microbiol.*, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2008.
- TRAGUST, S.; MITTEREGGER, B.; BARONE, V.; KONRAD, M.; UGELVIG, L.V.; CREMER, S. Ants disinfect fungus-exposed brood by oral uptake and spread of their poison. *Curr. Biol.*, v. 23, n. 1, p. 76-82, 2013.
- TRAGUST, S. External immune defence in ant societies (Hymenoptera: Formicidae): the role of antimicrobial venom and metapleural gland secretion. *Myrmecological news*, v. 23, p. 119-128, 2016.
- VIEIRA, A. S.; BUENO, O. C. Mitochondrial and peroxisomal population in post-pharyngeal glands of leaf-cutting ants after lipid supplementation. *Micron*, v. 68, p. 8-16, 2015.
- WARD, P. S., editor (2013). AntWeb: Ants of California. Disponível em: <http://www.AntWeb.org/california.jsp>. Acesso em 26 outubro 2018.
- WARD, P. S., BRADY, S. G., FISHER, B. L., & SCHULTZ, T. R. The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). *Syst. Entomol.*, v. 40, n. 1, p. 61-81., 2014.