

---

**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**

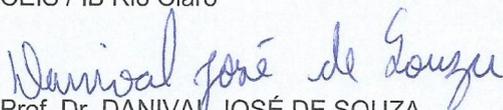
**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: O PAPEL DAS SECREÇÕES DAS FORMIGAS-CORTADEIRAS NA DEFESA DA COLÔNIA**

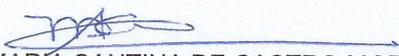
**AUTORA: MAYARA CRISTINA PEREIRA**

**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 lático, 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  $\mu$ M) 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: log dos valores de concentração .....95

Figura 6 - Curva de inibição da germinação de esporos de *Syncephalastrum* sp. *anisopliae* após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). C: controle. A: 200x.....	100
Figura 13 - Curva de inibição da germinação de esporos de <i>Beauveria bassiana</i> após tratamento com TL+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e a misturas dos dois compostos (TS+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). C: controle. A: 200x.....	101
Figura 15 - Curva de inibição da germinação de esporos de <i>Beauveria bassiana</i> após tratamento com TS+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 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 *Atta sexdens* e amostras do fungo *L. gongylophorus* 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 *Atta sexdens* após contaminação com *Escovopsis* sp. e iscas tóxicas. ....72

Tabela 5 - Valores de absorvância e concentração de peróxido de hidrogênio nas amostras de líquido fecal (LF) e secreção da glândula mandibular (SGM) de *Atta sexdens* (Amplex Test). ....74

Tabela 6 - Valores de absorvância e concentração de peróxido de hidrogênio nas amostras de líquido fecal (LF) e secreção da glândula mandibular (SGM) de *Atta sexdens* (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
<b>Capítulo 1</b>	
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
<b>Capítulo 2</b>	
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 láctico .....	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 láctico .....	75
5. Discussão .....	77

6. Conclusão.....	80
<b>Capítulo 3</b>	
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 láctico .....	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, conseqüentemente, 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 simbiotes, 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 metapleural 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 Agricola*. 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* v. 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>.

## *Capítulo 1*

*Revisão sistemática dos mecanismos de defesa em formigas  
(Hymenoptera: Formicidae)*

## RESUMO

A presença de patógenos é, particularmente, um problema significativo para insetos sociais, já que suas colônias, normalmente, contêm densa agregação de indivíduos altamente relacionados, o que facilita a transmissão de doenças. Por outro lado, a vida em grupo pode favorecer o desenvolvimento da imunocompetência entre os indivíduos e de toda a colônia a partir da imunidade social. Isso porque comportamentos sociais adaptativos e os mecanismos de defesa relacionados geram o que podemos chamar de profilaxia social, medidas preventivas adotadas para manutenção de um ambiente asséptico, ou seja, livre de patógenos no ninho. Alguns fatores como: variações no ambiente, nível de organização social, “status” reprodutivo e densidade populacional modulam o investimento na imunidade e, por isso, os mecanismos de defesa diferem entre espécies e até entre populações de formigas. Aqui apresentamos uma revisão sistemática dos mecanismos de defesa das formigas (Hymenoptera: Formicidae) a fim de construir um panorama do que se têm produzido na comunidade científica acerca das respostas imunes de diferentes espécies de formigas contra patógenos. Os mecanismos de defesa abordados foram agrupados em categorias após o levantamento bibliográfico, o que facilita a avaliação de quais temas estão sendo mais discutido nas pesquisas da área. O levantamento não restringiu período de publicação dos trabalhos. Os percentuais de cada categoria foram estabelecidos quanto ao número de artigos que tratam do tema em relação ao total de 78 trabalhos científicos selecionados. As categorias mais abordadas nas pesquisas foram a imunidade social (36%) e a defesa imune externa (31%), que incluem a defesa física de remoção de patógenos entre os indivíduos (grooming) e concomitantemente a defesa química com o espalhamento de secreções antimicrobianas advinda de glândulas exócrinas e endossimbiontes. Quanto as respostas defensivas das formigas, a categoria que esteve mais presente nos resultados foi a “secreções de antimicrobianos” e a menos abordada pelos autores foi a “melanização”, que está relacionada a defesa humoral e celular. Outros dados como os métodos mais utilizados pelos autores que tratam do tema foram avaliados nessa pesquisa. De maneira geral, as formigas combinam padrões comportamentais e características hereditárias para o estabelecimento de um ambiente livre de patógenos e o aumento da resistência de seus companheiros de colônia a doenças.

Palavras-chave: sistema imune, comportamento social, ambiente asséptico e profilaxia social.

## 1. Introdução

As formigas (Hymenoptera: Formicidae) apresentam diferentes mecanismos de defesa contra parasitas e são capazes de detectar e reagir a diferentes patógenos que atacam sua colônia. Por isso, esses insetos são considerados de difícil controle e dispõem de diferentes frentes de defesa ao serem contaminadas quando, por exemplo, carregam até o ninho iscas contendo compostos tóxicos ou fungos entomopatogênicos. O comportamento social, forrageamento e formas de nidificação favoreceram o surgimento de mecanismos de defesa em insetos sociais, uma vez que as características ecológicas desses animais aumentaram a pressão seletiva para evoluir fatores externos de defesa, no intuito de proteger a colônia (CREMER et al., 2007). Variação no ambiente, nível de organização social e densidade populacional do hospedeiro modulam o investimento na imunidade e, por isso, os mecanismos de defesa podem diferir entre espécies e até entre populações de formigas (OTTI et al., 2014; TRAGUST, 2016).

A secreção de antimicrobianos, que representa a defesa imune externa, protege o ninho e o alimento estocado e são normalmente produzidas por glândulas exócrinas, mas podem também ser derivadas de simbioses presentes no trato digestório das formigas. Essas secreções são aplicadas no ninho e, principalmente, nos indivíduos da colônia durante a realização de “grooming”, comportamento de limpeza muito comum em insetos sociais. As defesas química e física realizadas pelas formigas a partir de comportamentos adaptativos podem ser mais frequentes em casos de contaminação, mas ocorrem também cotidianamente gerando uma profilaxia social do ninho. Além desses mecanismos, quando infectadas, as formigas disponibilizam a defesa imune interna que responde com diferentes efetores, como células de defesa que fazem fagocitose e encapsulação, para erradicar ou incapacitar uma diversidade de agentes nocivos, como vírus, bactérias ou fungos (HOFFMANN et al., 1996;; MORGAN, 2008; ROSENGAUS et al., 2011; OTTI et al., 2014).

A comunidade bacteriana presente em Formicidae também é frequentemente relacionada à defesa. Muitas das bactérias simbióticas das formigas são encontradas em seu trato digestório, que é habitado por uma gama de microrganismos (endossimbiontes) ou estão presentes por toda sua cutícula (ectossimbiontes). O importante papel dos simbioses nos processos evolutivos das formigas diz respeito não somente a aquisição de nutrientes, mas também na produção de compostos eficazes nas respostas defensivas do organismo e no estabelecimento de uma resistência a doenças de toda a colônia. Os avanços nas técnicas de NGS (“next generation sequencing”) da biologia molecular possibilitou identificar a

comunidade bacteriana de muitas espécies de formigas, o desafio é relacionar esses microrganismos a funções como nutrição ou capacidade imune (ZIENTZ et al., 2005; SAPOUNTZIS et al., 2015; KELLNER et al., 2015).

Filogeneticamente, as formigas derivadas (do gênero *Atta* e *Acromyrmex*) possuem colônias maiores e organização social mais complexa com maior diferenciação morfológica de castas quando comparadas a formigas basais. Portanto, necessitam de uma defesa mais eficiente para proteção da prole e dos indivíduos adultos. Essas formigas, além de modular seus comportamentos e investimentos em defesa externa, podem também apresentar aumento no tamanho de glândulas exócrinas, como a glândula metapleurálica, para tornar mais eficiente a produção de antimicrobianos capazes de aumentar a proteção contra patógenos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; LACERDA et al., 2010; VIEIRA et al., 2012; TRAGUST, 2016).

A mais complexa interação descoberta na natureza ocorre nas formigas cultivadoras de fungo, com a associação de quatro organismos: formiga, fungo mutualista, fungo parasita e bactérias (YOUNGSTEADT, 2008). Estas bactérias pertencentes as Actinobacterias, como *Pseudonocardia*, colonizam estruturas especializadas da cutícula, cuja função principal é combater o fungo *Escovopsis*, considerado parasita especializado do jardim de fungos das formigas e não é conhecido de vida livre (LI et al., 2018)

Porém, durante a trajetória evolutiva dessas bactérias, ocorreu uma perda secundária, pois estão ausentes nas *Attina* cortadeiras de folhas do gênero *Atta* e parcialmente nas *Acromyrmex* (LI, et al., 2018). Acontece que *Escovopsis* está presente no jardim de fungos dessas formigas (CURRIE et al., 1999b; RODRIGUES et al., 2009) e, aparentemente, não causam danos à colônia. Ainda não se conhece qual é o mecanismo que controla o desenvolvimento do *Escovopsis* nos gêneros derivados das *Attina*.

Especula-se ainda que em colônias complexas, como as de formigas-cortadeiras, compostos químicos ou gases presentes no interior ninho podem gerar um microambiente imune que reduz a contaminação por patógenos invasores. Muitos estudos investigam os mecanismos defensivos, seja a produção de secreções antimicrobianas, a presença de ecto e endossimbiontes ou o comportamento social, de várias espécies de formigas. Relacionar esses mecanismos e verificar o que mais tem se produzido na comunidade científica colabora para construção de um panorama acerca do tema.

## **2. Objetivo**

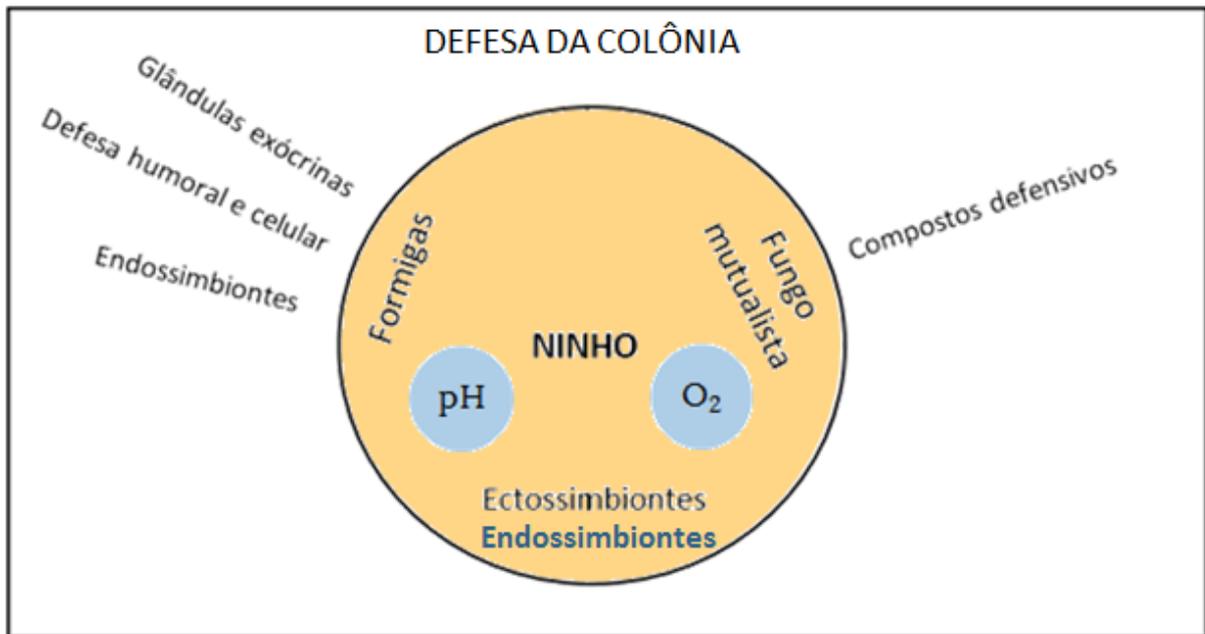
Realizar uma revisão sistemática dos mecanismos de defesa das formigas, buscando evidenciar: o que se tem produzido em maior escala acerca do tema na comunidade científica, quais respostas defensivas das formigas têm sido destacadas contra patógenos, quais subfamílias e gêneros de Formicidae têm sido alvo de pesquisas, quais métodos e espécies de microrganismos têm sido utilizadas em estudos sobre o tema.

## **3. Material e métodos**

Geralmente, os mecanismos de defesa das formigas-cortadeiras são estudados individualmente e estão focados na fisiologia do organismo da formiga, a descoberta de endo e ectossimbiontes e características do fungo simbiote. Para melhor conhecer as informações presentes no meio científico e integrar os diferentes fatores envolvidos na defesa imune das formigas-cortadeiras, esse estudo relacionou os três grandes organismos presentes no ninho que colaboram para o estabelecimento de um microambiente imune: as formigas, o fungo mutualista e os microrganismos simbiotes. Para tanto, buscou-se informações científicas que estivessem relacionadas à defesa imune interna, externa, participação dos simbiotes na defesa, ambiente do ninho e imunidade social.

A coleta de dados foi realizada em artigos e teses publicados nos seguintes banco de dados e bibliotecas digitais: Google Scholar, Web of Science, Science Direct, Pathernon e Periódicos da CAPES. A busca não restringiu período de publicação dos trabalhos e utilizou a combinação das seguintes palavras-chave: immunity, Formicidae, ants e defense. A seleção dos artigos pertinentes para o estudo se deu pela análise do título, das palavras-chave e do resumo e considerou necessariamente a investigação de fatores de defesa e propriedades imunitárias em qualquer gênero de formiga. Os artigos, quando selecionados, foram dispostos em diferentes categorias de análise de acordo com os tópicos estabelecidos nessa pesquisa (Figura 1).

Figura 1: Esquema representativo dos fatores que permeiam a defesa das colônias de formigas-cortadeiras.



O levantamento bibliográfico não buscou extrair dados quantitativos dos artigos selecionados e sim elencar quais as respostas obtidas pelos autores quanto a capacidade defensiva das espécies-alvo, as técnicas utilizadas para atender os objetivos da pesquisa, as espécies de formigas mais frequentemente estudadas e as espécies de microrganismos utilizadas no estudo também foram analisadas.

#### 4. Resultados e Discussão

Foram selecionados 78 artigos, sendo 74 de pesquisas e 4 de revisão. A revisão sistemática teve a finalidade de verificar como os assuntos relacionados à defesa das formigas têm sido direcionados nas pesquisas da área. Segundo o levantamento bibliográfico o trabalho menos recente encontrado sobre o tema foi publicado em 1979 e trata de um estudo realizado com o gênero *Neivamyrmex* (BROWN et al., 1979). A defesa das formigas contra patógenos reúne diferentes mecanismos, os quais atuam desencadeando respostas defensivas específicas na presença de um corpo estranho ou patógeno no ninho. A Tabela 1 apresenta os mecanismos de defesa, com o modo de ação e as respostas defensivas desencadeadas em caso de contaminação, que foram utilizados como categorias durante a separação do material científico obtido no levantamento bibliográfico.

Tabela 1 - Tópicos de agrupamento dos trabalhos científicos.

Mecanismo de defesa	Mecanismo específico	Modo/local de ação	Resposta defensiva	Referências
Defesa imune interna	Defesa humoral e celular	Enzima fenoloxidase e hemócitos	Fagocitose, encapsulação e melanização	Feldhaar;Gross et al., 2009 Dávila et al., 2015 Lavine;Strand et al., 2002
Defesa imune externa	Glândulas exócrinas	Glândula metapleural, de veneno, mandibular	Secreções antimicrobianas	Morgan, 2008 Vieira et al., 2012 Chen et al., 2013 Fernandez-Marin et al., 2015
Simbiontes	Endossimbiontes e ectossimbiontes	Trato digestório/intracelular e cutícula	Secreções antimicrobianas	Russel et al., 2009 de Souza et al., 2009/2011 Sapountzis et al., 2015 Ramalho et al., 2017
Ambiente do ninho	Microfungos e gases	Voláteis	Voláteis Antimicrobianas	Castella et al., 2008 Römer et al., 2017
Imunidade social	Resistência a doenças	Estrutura social	Resistência, grooming, dieta, isolamento	Cremer et al., 2007 Bos et al., 2002 Konrad et al., 2012 Tragust et al., 2013 Otti et al., 2014

A utilização de tópicos para o agrupamento dos trabalhos científicos relacionados facilita a análise do que se tem produzido para cada subtema dos mecanismos de defesa das formigas. A Figura 2 mostra a distribuição do número de artigos das categorias abordadas nos diferentes períodos de publicação. A análise dos dados se deu pela obtenção do percentual de trabalhos que estão agrupados em cada grande categoria, que são elas: mecanismo de defesa (Figura 3), as respostas defensivas (Figura 4), os métodos utilizados (Figura 5), as subfamílias e gêneros de formigas alvo de estudo (Figura 6) e as espécies de microrganismo utilizadas (Figura 7). As porcentagens geradas para cada categoria de defesa são apresentadas graficamente e mostram a tendência com que esse assunto tem sido estudado na comunidade científica.

É importante salientar que um único artigo pode ter utilizado mais de uma espécie de formiga e microrganismo na pesquisa e pode ter apresentado mais que uma resposta defensiva em cada caso.

Figure 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.

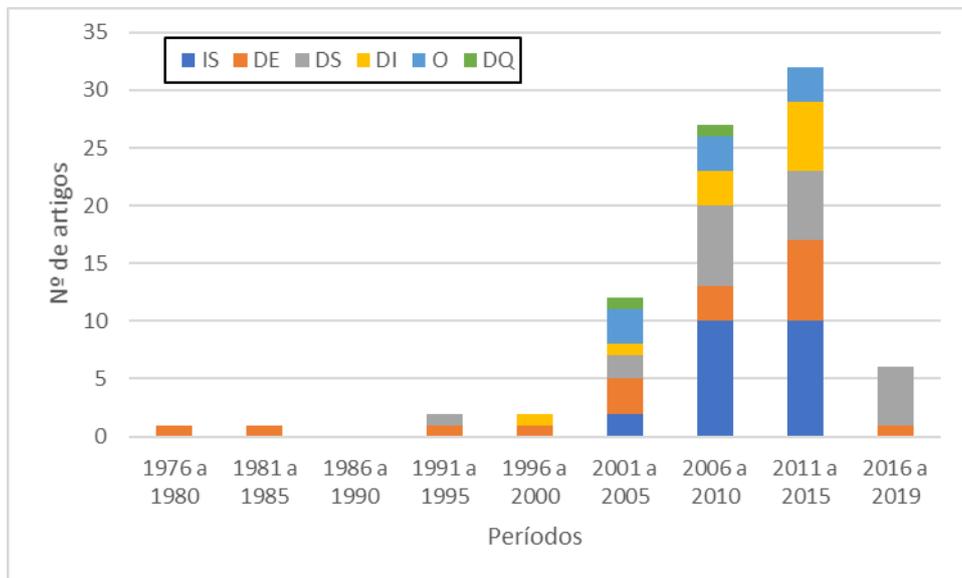


Figure 3: Distribuição percentual dos trabalhos agrupados por “mecanismo de defesa”.

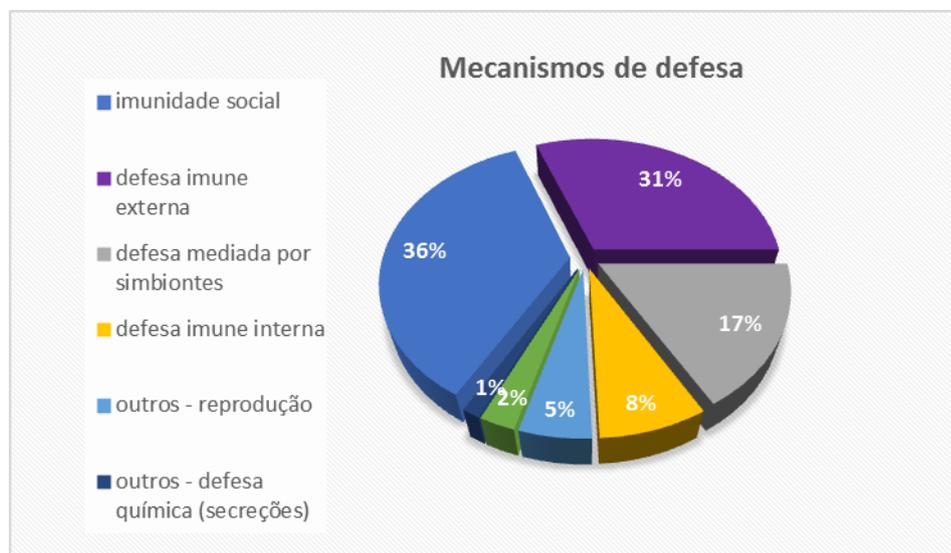


Figura 4 – Distribuição percentual de artigos que encontraram diferentes respostas defensivas desencadeadas pelos mecanismos de defesa



Figura 5 – Distribuição percentual de artigos que utilizaram diferentes métodos de pesquisa

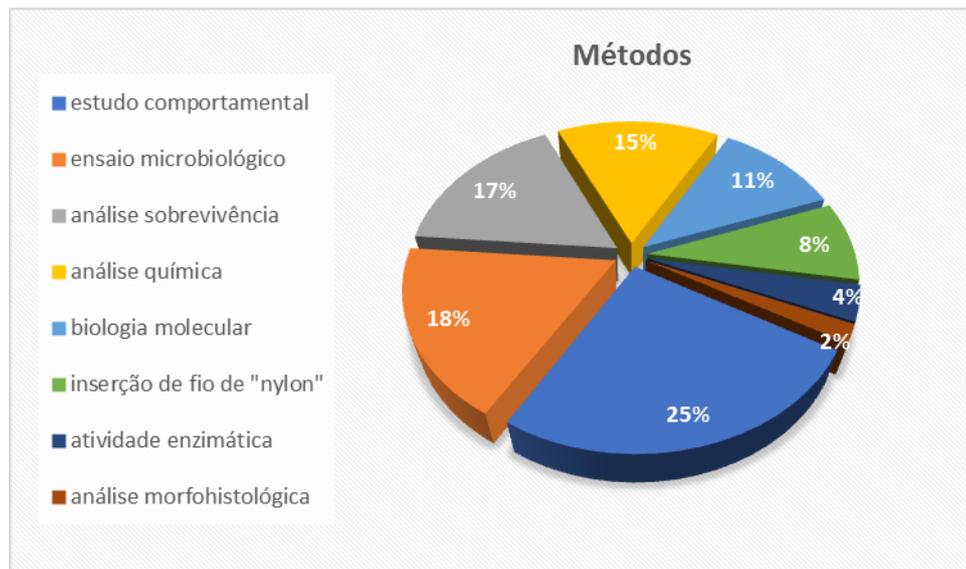


Figura 6- Distribuição percentual de artigos em relação a subfamília e ao gênero de formiga alvo de pesquisa

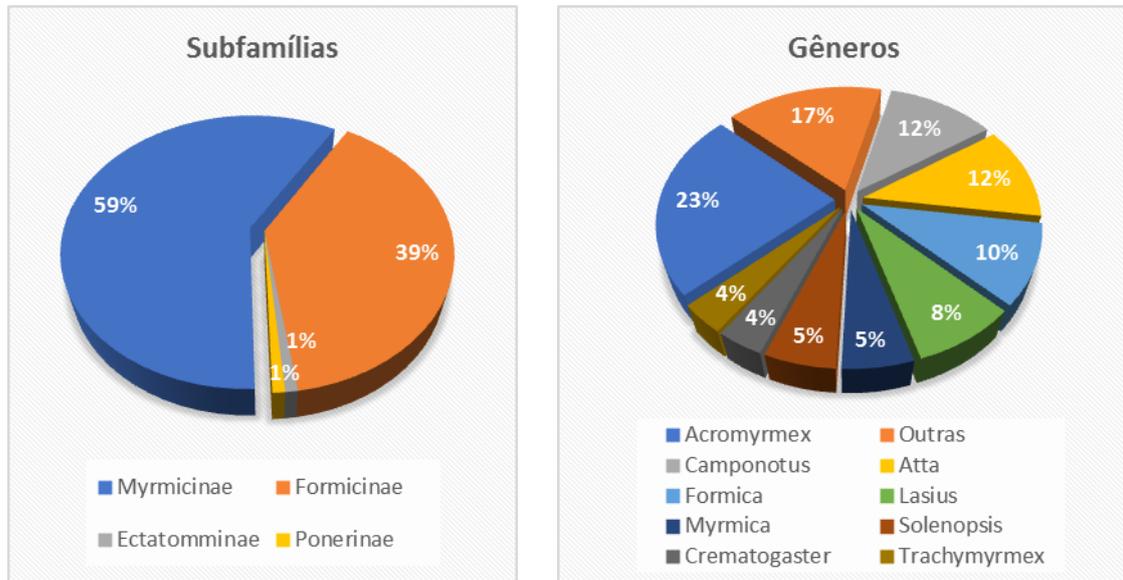
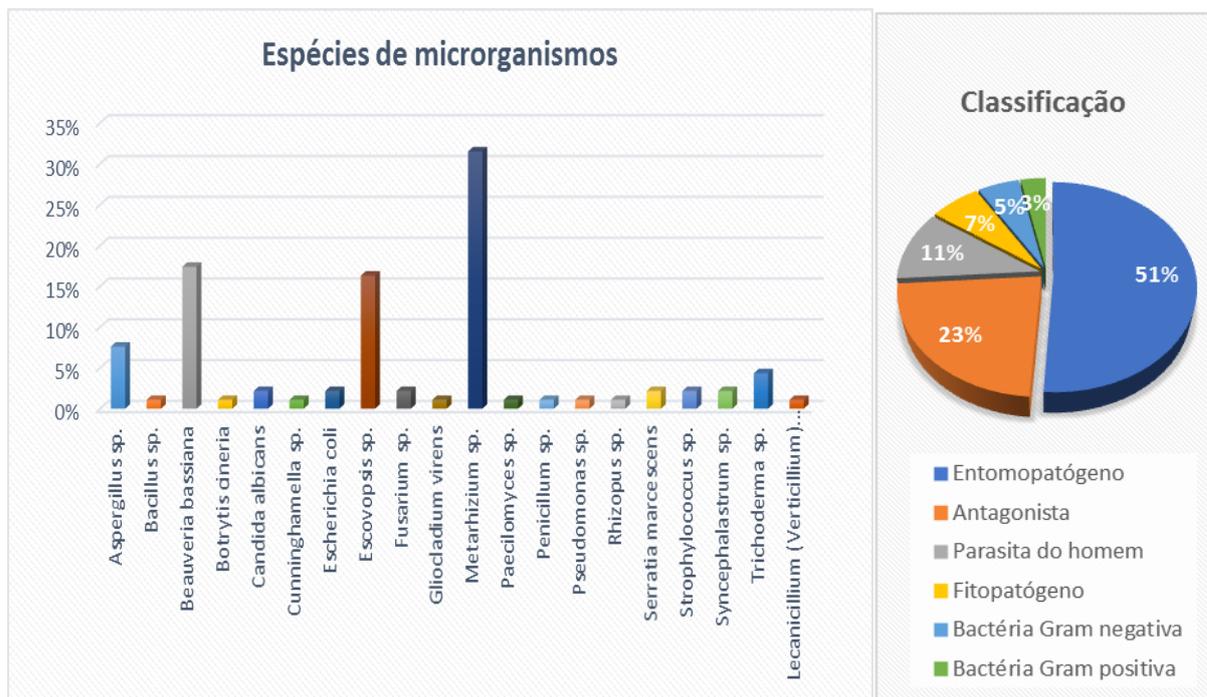


Figura 7 - Distribuição percentual de artigos em relação à espécie de microrganismo utilizada e sua classificação



As categorias mais recorrentes quanto aos mecanismos de defesa foram: a defesa imune externa, relacionada à produção de secreções antimicrobianas por glândulas exócrinas como as glândulas metapleurais, mandibular e de veneno; e a imunidade social, que está relacionada à estrutura social e ao comportamento dos indivíduos da colônia como o “allogrooming”, o isolamento de indivíduos contaminados e remoção de cadáveres (Figuras 3

e 4). O levantamento dos principais métodos de pesquisa utilizados nos estudos apresentou percentual semelhante para: estudos comportamentais (25%), estudos microbiológicos (18%), análise de sobrevivência (17%) e análise química (15%) (Figura 5).

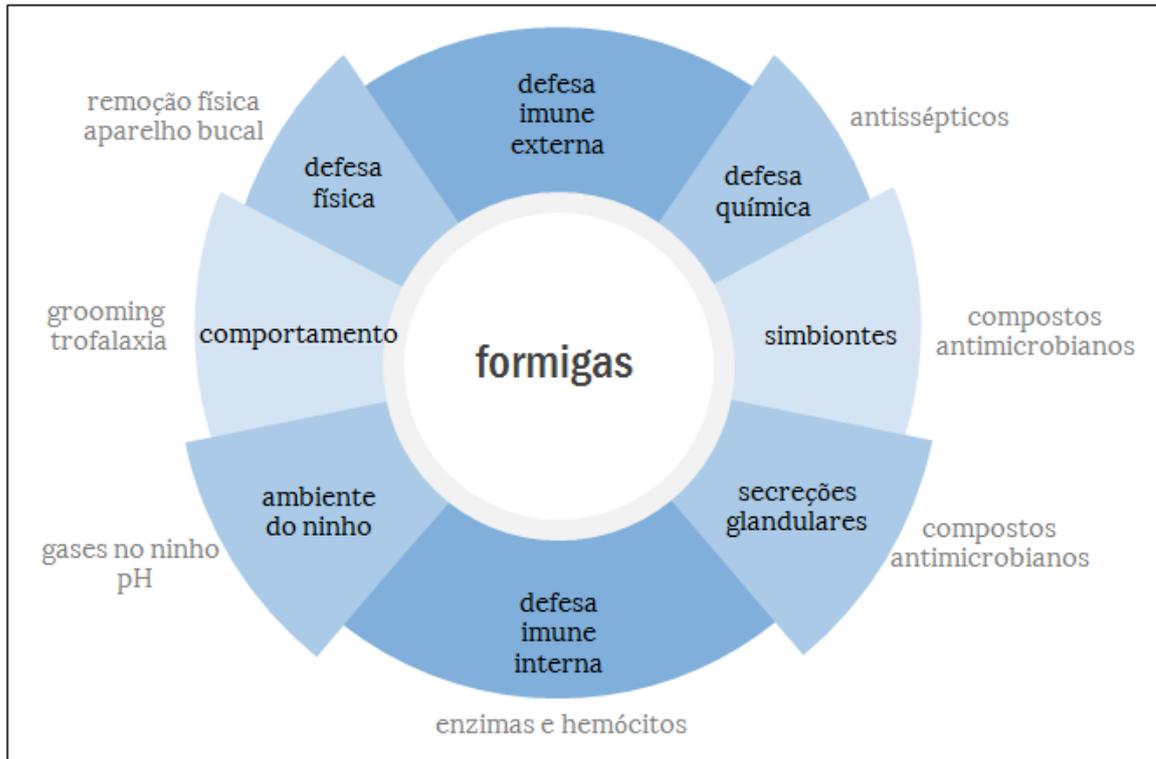
Tanto a disseminação de secreções antimicrobianas quanto aspectos comportamentais dizem respeito a defesas imunológicas cooperativas baseadas em adaptações organizacionais nos insetos sociais, em que tarefas imunitárias são compartilhadas entre os membros do grupo (OTTI et al., 2014). De maneira geral, as formigas combinam padrões comportamentais, alterações fisiológicas e químicas para eliminar patógenos com potencial para prejudicar a colônia e, por isso, temas como produção de compostos antibióticos por glândulas exócrinas, comportamento de limpeza e isolamento de indivíduos contaminados são destaque na comunidade científica (SCHULTZ, 1999; MUELLER et al., 2001).

Quanto as espécies alvo de estudo verificamos que Myrmicinae é a subfamília que aparece em maior número de artigos (59%), os gêneros *Acromyrmex*, *Atta* e *Myrmica*, pertencentes a essa subfamília, foram os mais recorrentes nos estudos representando 39%, 19% e 9% do total, respectivamente (Figura 6). Considerando que Formicidae engloba 334 gêneros, verificamos que poucos gêneros (apenas nove que aparecem em mais de um artigo) apareceram como alvo de estudo no levantamento realizado. Evidenciando que ainda muitos estudos nessa área são necessários.

Quanto aos microrganismos utilizados em ensaios microbiológicos de contaminação e análise de sobrevivência, os fungos entomopatógenos (51%), como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium* spp., e os fungos antagonistas (23%), como *Trichoderma* spp., *Escovopsis* sp., *Syncephalastrum* spp., foram os mais frequentes. A espécie *M. anisopliae* e *M. brunneum* apareceram em muitos artigos selecionados e juntas correspondem a 32% do total (Figura 7). Esse gênero tem sido estudado como potencial produto para o controle biológico de formigas-cortadeiras.

Os temas que integram a defesa imunológica das formigas estão resumidos na Figura 8 e os itens a seguir discutem os resultados encontrados no levantamento de dados para cada mecanismo de defesa.

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.



#### 4.1. Imunidade social

O termo imunidade social diz respeito a defesas imunológicas cooperativas baseadas em padrões comportamentais observados em insetos sociais, que atuam na proteção dos companheiros de colônia contra infecções, seja pelo comportamento de limpeza, compartilhamento de antimicrobianos e outros. As adaptações comportamentais que ajudam na disseminação de secreções antimicrobianas, reduzindo o risco de infecção do ninho, também podem ser consideradas estratégias da defesa imune externa. Mas como se trata de comportamentos colaborativos entre os companheiros de colônia que buscam sempre privilegiar a assepsia do ninho e o bem-estar da colônia, podemos chamar esse mecanismo de imunidade social (CREMER et al., 2007; FEFFERMAN et al., 2007; OTTI et al., 2014).

A presença de patógenos é, particularmente, um problema significativo para insetos sociais, pois suas colônias, normalmente, contêm densa agregação de indivíduos altamente relacionados, o que facilita a transmissão de doenças. Por outro lado, a vida em grupo pode facilitar o desenvolvimento de resistência a doenças entre os indivíduos do grupo e até gerar uma profilaxia social. A defesa dos insetos sociais se divide em dois níveis: o nível individual, como as respostas imunes fisiológicas, e o nível de grupo que inclui comportamentos sociais que favorecem a remoção de parasitas e aumentam a resistência

contra doenças (ROSENGAUS et al., 1999; HUGHES et al., 2002; TRANIELLO et al., 2002; BOOMSMA et al. 2005; UGELVIG; CREMER, 2007).

Os comportamentos considerados estratégias da imunidade social são, portanto, a remoção física de patógenos com uso das peças bucais como mandíbula e glossa e a cavidade infrabucal que funciona como filtro para partículas sólidas; e a defesa química que é a disseminação de compostos antimicrobianos advindos das glândulas exócrinas, como a metapleural, a mandibular e a de veneno. Os comportamentos de limpeza e, conseqüentemente, remoção de patógenos e disseminação de compostos químicos são realizados cotidianamente pelas formigas, mas podem se tornar mais frequentes quando a colônia está ameaçada pela presença de um contaminante. Esse comportamento é chamado de “grooming” ou “self-grooming”, quando se trata de autolimpeza, e de “grooming social” ou “allogrooming”, em que os indivíduos limpam uns aos outros. Outros comportamentos relacionados a imunidade são, por exemplo, a remoção de indivíduos contaminados ou mortos da colônia e a automedicação (CREMER et al., 2007; UGELVIG; CREMER, 2007; COTTER; KILNER, 2010; OKUNO et al., 2012; TRANTER; HUGHES, 2015).

A resposta imune social pode até ser transferível com a interação de indivíduos sadios com os que já foram expostos a um parasita ou então conter componentes adaptativos que melhoram a imunocompetência de todo grupo após a exposição a uma ameaça de doença. Isso acontece de modo que a exposição prévia da colônia a um patógeno pode torná-la imunizada e melhorar sua resposta caso volte a se contaminar. Em *A. echinator* e *Formica selysi*, colônias que já tinham sido expostas a *M. anisopliae* tiveram resposta imune mais efetiva quando contaminadas pela segunda vez, aumentando o comportamento de “self-grooming” e “allogrooming”. Entretanto, a exposição inicial de *F. selysi* ao fungo *B. bassiana* não alterou sua resistência em um desafio subsequente com o mesmo fungo, mostrando que a imunização primária pode variar entre os patógenos (ROSENGAUS et al., 1998; WALKER; HUGHES, 2015; REBER et al., 2006; REBER; CHAPUISAT et al., 2012).

O contato de indivíduos sadios com indivíduos expostos a contaminação pode assumir funções profiláticas, ou seja, medidas que previnem doenças, ou então funcionar com aplicação de antissépticos, que inibem a proliferação de microrganismos e reduzem a infecção. O intenso allogrooming entre formigas com conídios fúngicos aderidos à cutícula e formigas sadias, possibilita a passagem de pequena quantidade de patógenos da superfície, causando infecções de baixo nível. Essas infecções raramente levam a morte, mas promovem uma regulação positiva de genes imunes envolvidos nas defesas antifúngicas (defensina e

propenoxidase) que parece ser específica, já que não há regulação positiva para genes associados a defesas antibacterianas e antivirais nesse caso (KONRAD et al., 2012).

Outro exemplo de imunização social ativa pôde ser observado em *Lasius neglectus*, em que a cria quando exposta a fungos patógenos além de receber intensa limpeza para remoção mecânica dos esporos fúngicos, recebem também a desinfecção química a partir da aplicação de veneno pelas operárias. O veneno, que tem como principal componente ativo o ácido fórmico, é absorvido pela boca das operárias no comportamento de self-grooming do acidóporo e subsequente aplicado na superfície infecciosa da cria, a partir do allogrooming. O composto funciona, portanto, como desinfetante e inibe o crescimento fúngico na cria e impede a contaminação de toda a colônia (TRAGUST et al., 2013).

A trofalaxia é também um comportamento comum nos insetos sociais, e trata-se da alimentação mútua através da regurgitação que pode acontecer pela boca-boca (estomodeal) ou boca-ânus (proctodeal). Esse comportamento também aumenta a imunocompetência em nível de colônia nas formigas e se torna mais recorrente quando a colônia está contaminada ou imunizada, ou seja, que esteja sendo exposta pela segunda vez ao mesmo contaminante. Em *Camponotus pennsylvanicus*, colônias imunizadas apresentaram aumento da atividade antimicrobiana da gota de trofalaxia, devido a maior quantidade da proteína catepsina D. Por outro lado, a contaminação com peptidoglicano de *Camponotus fellah* reduziu a resposta de encapsulação dos indivíduos contaminados, o que pode ter sido suprido pelo aumento do comportamento social. Esses exemplos revelam uma resposta combinada, comportamental e imunológica, que representa um mecanismo efetivo a resistência social a doenças (de SOUZA et al., 2008; HAMILTON et al., 2011; MOREIRA et al., 2015).

A vida em grupo, apesar de favorecer o desenvolvimento de uma resistência a doenças, pode também facilitar a transmissão dos patógenos e, por isso, algumas espécies de formigas apresentam comportamentos adaptativos quando infectadas para reduzir o risco de infecção de toda a colônia. Indivíduos contaminados podem ser mais agressivos, reduzir as interações sociais com adultos e crias e, até, passar maior parte do tempo fora do ninho após alguns dias de infecção. Mesmo operárias, que estão morrendo espontaneamente em colônias de observação, exibem o mesmo conjunto de comportamento de se isolarem de seus companheiros dias ou horas antes da morte. A saída ativa do formigueiro e a interrupção das interações sociais pode ser um traço altruísta na evolução da sociabilidade após infecção em um animal social (HEINZE; WALTER; 2010; BOS et al., 2012).

As respostas imunes podem variar não somente entre as espécies, mas também quanto a casta e idade dos indivíduos da colônia. Um exemplo disso é que operárias mais velhas

podem apresentar aumento significativo de fenoloxidase, enzima efetiva do sistema imune humoral, como resposta adaptativa ou indicativa de imunossenescência. Por outro lado, em formigas-cortadeiras verificou-se que a taxa de encapsulação diminui à medida que as operárias envelhecem e trocam de tarefas. De forma que, as operárias mínimas que realizam atividades internas no ninho exibem maior taxa de encapsulação do que as mais velhas que trabalham fora da colônia, isso porque a contaminação das operárias mínimas pode significar a contaminação de todo o jardim de fungo. Isso reitera que os comportamentos sociais de cuidados mútuos dentro da colônia não eliminam a necessidade de respostas imunológica a nível individual, as quais podem sofrer alteração desde os estágios iniciais até a senescência (ARMITAGE; BOOMSMA, 2010; RIBEIRO et al., 2011; ROSENGAUS et al., 2013; LACERDA et al., 2014).

A imunidade social foi o mecanismo de defesa que mais reuniu artigos, correspondendo a 36% do total (Figura 3). As respostas defensivas mais discutidas pelos autores que tratam desse mecanismo foram o grooming, a encapsulação, o isolamento de indivíduos contaminados, enzima fenoloxidase, a remoção de cadáveres e a dieta, que correspondem a 17%, 9%, 7%, 5%, 2% e 2% do total, respectivamente (Figura 4). O “grooming” é de fato o comportamento mais avaliado em estudos sobre imunidade social, pois o contato direto entre os indivíduos da colônia durante as atividades de limpeza pode facilitar a transmissão de doenças, mas é também uma importante estratégia que favorece a imunocompetência de todo o grupo. Os principais métodos de pesquisa utilizados nos estudos selecionados nessa categoria são: estudo comportamental, análise de sobrevivência e inserção de fio de nylon, que correspondem a 25%, 17% e 8% do total, respectivamente (Figura 5).

#### **4.2. Defesa imune externa (glândulas exócrinas)**

A defesa imune externa inclui qualquer característica hereditária atuando no ambiente capaz de melhorar a proteção dos insetos contra patógenos. Dentre essas características, a especialização de algumas glândulas exócrinas para produção de secreções antimicrobianas atua de forma significativa na defesa das formigas contra patógenos. Os compostos químicos encontrados em glândulas exócrinas estendem-se sobre um amplo espectro de compostos orgânicos voláteis, alguns com propriedades antibióticas que são utilizados na defesa da colônia. Além das propriedades antimicrobianas, a produção de ácido fórmico pela glândula de veneno e compostos da glândula de Dufour são importantes no deslocamento entre espécies no ambiente (MORGAN, 2008; CHEN et al., 2013; OTTI et al., 2014).

Dentre as glândulas exócrinas estão: a glândula mandibular, a glândula de veneno, a glândula de Dufour e a glândula metapleural, esta última é a mais estudada em formigas por ser exclusiva a esse grupo animal. O composto “mirmicacina” é um exemplo de antimicrobiano encontrado na glândula metapleural de *A. sexdens* que impede a germinação de fungos antagonistas. Recentemente o ácido fenilacético foi encontrado na secreção da glândula metapleural e também apresentou ação eficaz na redução da taxa de germinação de fungos isolados do ninho de *Atta*, como *Escovopsis* e *Metarhizium* (MASCHWITZ et al., 1970; ORTIUS-LECHNER et al., 2000; BOT et al., 2002; FERNÁNDEZ-MARIN et al., 2015).

Os compostos mais abundantes encontrados na glândula metapleural de *A. laevigata* Smith, 1858 foram hidroxiácidos e ácido fenilacético, em *Acromyrmex coronatus* Fabricius, 1804 apenas os hidroxiácidos estão presentes. A secreção dessa glândula fica espalhada por toda a cutícula do exoesqueleto do inseto, o que a torna incomum entre as glândulas exócrinas ao não ter retenção de secreção. A identidade química e a quantidade de diferentes compostos na secreção dessa glândula depende do tipo de colônia e do método utilizado, mas em todos os casos apresenta função antibiótica e capacidade de inibir o crescimento de todos os microrganismos testados (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; VIEIRA et al., 2012; FERNÁNDEZ-MARIN et al., 2015).

Sabe-se também que a glândula metapleural pode apresentar variação de tamanho em diferentes castas. Em *A. echinator*, por exemplo, as operárias pequenas têm glândulas metapleurais proporcionalmente maiores quando comparadas a operárias grandes, o que lhes garante maior sobrevivência quando contaminadas com doses de esporos correspondentes a diferença na massa corporal das duas castas (POULSEN et al., 2006). Quanto ao ácido fenilacético, as operárias menores de *Atta* são as principais responsáveis em reduzir a taxa de germinação fúngica após aplicar ativamente esse composto sobre os alvos. Isso sugere que essa casta é particularmente adaptada para impedir a contaminação da colônia e que a diferenciação de castas bem definida em formigas-cortadeiras de folha trata-se de uma estratégia evolutiva contra micopatógenos (FERNÁNDEZ-MARIN et al., 2015).

A pressão parasitária ao longo do tempo provoca uma série de transições evolutivas na qualidade, quantidade e uso das secreções da glândula metapleural. De maneira que, o uso da secreção da glândula metapleural é regulado por um mecanismo de liberação muscular controlado comportamentalmente e que se ajusta quantitativa e qualitativamente à infecção fúngica específica de acordo com a virulência do fungo (YEK et al., 2012; TRANTER et al., 2015).

O sistema de defesa da glândula metapleural possui características de ajuste semelhantes a um sistema imune cuticular presente na maioria das espécies de formigas: a presença de bactérias simbiotes do gênero *Pseudonocardia*. O crescimento dessas bactérias na cutícula começa alguns dias após emergir a operária e sua cobertura máxima ocorre após 2 ou 3 semanas. A cobertura da cutícula por essa bactéria é regulada de acordo com a exposição do indivíduo à contaminantes e diminui gradualmente durante a vida das operárias. O fechamento experimental da glândula metapleural reduziu significativamente a cobertura durante a fase de declínio do crescimento bacteriano, demonstrando que a regulação desses dois mecanismos de defesa é interligada (POULSEN et al., 2003).

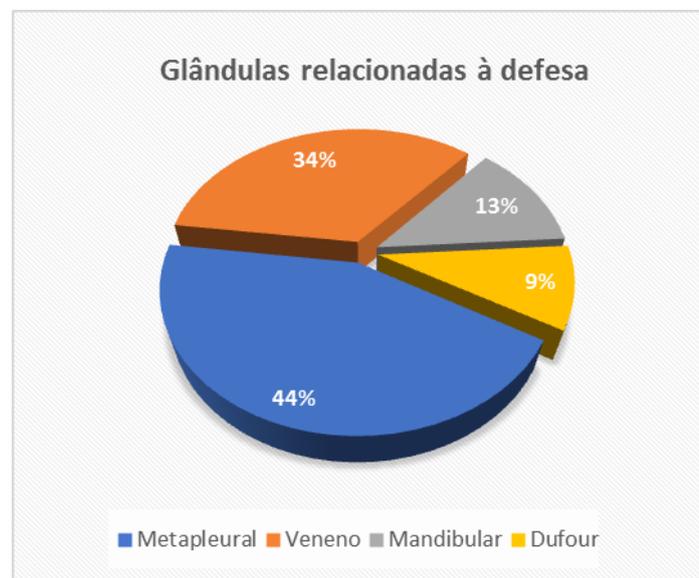
As secreções antimicrobianas das glândulas exócrinas são utilizadas pelas operárias adultas para defender o ninho, o fungo mutualista (em algumas espécies) e os indivíduos da colônia, incluindo a cria (ovos, larvas e pupas) que é mais vulnerável a contaminações. Alguns gêneros que não possuem glândula metapleural, como *Polyrhachis* e *Camponotus*, a glândula de veneno desempenha importante função na sanitização do material do ninho e proteção da ninhada. Em ninhos onde operárias adultas tiveram suas glândulas produtoras de antimicrobianos bloqueadas experimentalmente houve um crescimento significativo de fungos oportunistas sobre a cria, o que certamente afetaria o desenvolvimento da colônia. Compostos da glândula mandibular de *Calomyrmex* sp. e da glândula de Dufour de *Crematogaster* sp. também apresentam ação antibiótica (DALOZE, 1991; BROUGHT et al., 1983; TRANTER et al., 2014).

Alguns estudos têm direcionado a atenção para o uso das secreções da glândula mandibular na inibição de microrganismos de importância econômica ou de importância médica. Compostos como ácidos citral, geraniol, 4-metil-3-heptanol, hexanoico e octanoico que foram encontrados na secreção da glândula mandibular de *A. sexdens* foram eficazes na inibição de patógenos humanos importantes como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Além disso, secreções dessa mesma espécie de formiga tiveram efeito inibitório de 94,2% na germinação dos conídios de *Botrytis cinerea*, fungo que ataca várias espécies de plantas cultivadas de importância econômica. Isso aponta para o isolamento de compostos da secreção de glândulas exócrinas para uso em produtos comerciais como fungicidas ou antibióticos (MARSARO JÚNIOR et al., 2001; de LIMA MENDONÇA et al., 2009).

A defesa externa conferida pela secreção das glândulas exócrinas foi o segundo mecanismo de defesa com maior número de artigos levantados nessa revisão, representando 31% do total (Figura 3). A resposta defensiva mais citada em artigos sobre glândulas

exócrinas é a secreção de antimicrobianos, que representa 38% do todas as respostas defensivas atribuídas durante o levantamento (Figura 4). Os principais métodos utilizados no estudo desse tema são análise de sobrevivência, análise química e estudos microbiológicos, que representam 16%, 15% e 7% dentre todos os métodos definidos nesta busca, respectivamente (Figura 5). Portanto, esse tem sido um tema de destaque no meio científico quando se trata dos mecanismos de defesa utilizados pelas formigas contra patógenos. Estudos ainda são necessários para compreender o potencial defensivo de glândulas exócrinas que não a metapleurar, visto que 44% dos trabalhos trataram dessa glândula (Figura 9).

Figura 9 - Distribuição percentual dos artigos relacionados à estudos com quatro diferentes glândulas de Formicidae.



#### 4.3. Defesa mediada por simbioses

Dentre os Hymenoptera, Formicidae é frequentemente relacionada à presença de endossimbiontes. A composição desta comunidade bacteriana varia entre os táxons de formigas e sabe-se que fatores fisiológicos e ambientais influenciam na colonização. Muitas das bactérias simbióticas das formigas são encontradas em seu trato digestório, que é habitado por uma gama de microrganismos. O importante papel dos simbioses na evolução das formigas, diz respeito a aquisição de nutrientes, e também a respostas defensivas e resistência a doenças. Apesar das formigas apresentarem uma das mais complexas simbioses microbianas, pouco se conhece sobre a biologia desta relação (RUSSELL et al., 2009; ZIENTZ et al., 2005; SAPOUNTZIS et al., 2015; KELLNER et al., 2015).

A utilização da tecnologia NGS (“next generation sequencing”) viabiliza a caracterização da comunidade bacteriana associadas à diversas formigas. Entre as *Attina*, desde espécies basais cultivadoras de fungos como *Mycocepurus smithii*, até aquelas derivadas, como *Acromyrmex* sp., *A. texana* e *A. sexdens* tiveram suas comunidades bacterianas caracterizadas. Mas muitos estudos ainda visam a caracterização nessas espécies, já que novos simbiontes são comumente descobertos no mesmo hospedeiro, que pode estar competindo ou cooperando no organismo (LOMBARDO, 2008; KELLNER et al., 2015; SAPOUNTZIS et al., 2015; MEIRELLES et al., 2016; VIEIRA et al., 2017; RAMALHO et al., 2017).

Apesar do papel desses microrganismos na defesa contra patógenos continuar a ser um benefício subestimado destas associações, alguns gêneros de bactérias têm sido associados a defesa das formigas cultivadoras de fungo. Na trajetória evolutiva, as *Attina* adquiriram modificações cuticulares complexas selecionadas para manutenção de bactérias benéficas em suas cutículas. As actinobactérias do gênero *Pseudonocardia* e *Streptomyces*, que estão associadas a cutícula das formigas, protegem os indivíduos e o jardim de fungo contra patógenos. Essas apresentam atividade antagônica ao fungo *Escovopsis*, frequentemente isolado em colônias de formigas-cortadeiras. Esses microrganismos variam seus efeitos contra fungos filamentosos e apresentam potencial contra várias espécies de fungos patógenos, além de serem importantes para a saúde individual das operárias e conferir proteção às jovens operárias até a maturação do sistema imune (VAUTRIN et al., 2008; SEN et al., 2009; MUELLER et al., 2001; MATTOSO et al., 2012; de SOUZA et al., 2013; KELLNER et al., 2015; DÂNGELO et al., 2016; LI et al., 2018).

Dentre os patógenos, *Escovopsis* spp. são considerados micoparasitas especializados e muito frequentes nos jardins de fungos de formigas-cortadeiras. Sabe-se que o parasitismo por *Escovopsis* do jardim do fungo de *Attina* teve uma única origem evolutiva, que é congruente com a evolução das formigas e seus cultivares fúngicos. Porém, durante a trajetória evolutiva das actinobactérias, ocorreu uma perda secundária, pois estão ausentes na cutícula das *Attini* cortadeiras de folhas do gênero *Atta* e parcialmente nas *Acromyrmex* (CURRIE et al., 2003). E não se conhece qual é o mecanismo que controla o desenvolvimento do *Escovopsis* nos ninhos dos gêneros derivados das *Attina*, onde é frequentemente encontrado (MUCHOVEJ; DELLA LUCIA, 1990; CURRIE et al., 1999b; TAERUM et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008; HAIFIG, 2014; LI et al., 2018).

A proteção mediada por simbiontes ainda tem seus mecanismos de ação pouco conhecidos, mas o fato de aumentar a capacidade do hospedeiro de se defender contra

infecção ou predação a caracteriza como sistema defensivo adicional dos insetos. Na maioria dos casos, a proteção resulta da produção de toxinas e antibióticos que reduzem os efeitos dos patógenos e buscam eliminá-los. Os *Streptomyces*, por exemplo, produzem metabólitos antifúngicos potentes que são alvo-específicos que inibem o crescimento do parasita *Escovopsis*. Macrófilos de candidina foram identificados em estirpes de *Streptomyces* sp. isoladas de três espécies do gênero *Acromyrmex*, além de compostos de antimicina múltiplos e antibióticos do tipo gramicidina e mannopeptimicina eficazes contra patógenos (SCHNEIDER; CHAMBERS, 2008; DEGNAN; MORAN, 2008; HAEDER et al., 2009; SCHOENIAN et al., 2011; SEIPKE et al., 2011).

Endossimbiontes encontrados no trato digestório das formigas também têm importante participação no desenvolvimento das colônias e sua estabilidade, como por exemplo o gênero *Blochmannia*, simbiote obrigatório das formigas do gênero *Camponotus*. Colônias incipientes de *Camponotus* sp. quando tratadas com antibiótico, para reduzir o número de bactérias endossimbiontes, apresentam número reduzido de operárias e imaturos, redução no tamanho corporal e redução das colônias, demonstrando o importante papel desse simbiote no crescimento e desenvolvimento da colônia (de SOUZA et al., 2009; SINOTTE et al., 2018).

Em estudos imunológicos com uso de antibióticos, a ausência da *Blochmannia* nas operárias aumentou sua resposta de encapsulação e melanização da cutícula, sugerindo que as formigas precisam aumentar sua resposta efetiva de defesa interna quando não colonizada e, por isso, que a presença do simbiote melhora sua resistência. Por outro lado, em situação similar, a taxa de melanização cuticular foi reduzida quando havia níveis baixos desse simbiote e as operárias apresentaram maior resistência contra o fungo *Metarhizium brunneum*, sugerindo que o simbiote reduz a capacidade das formigas de combater a infecção e gera um trade-off crítico. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar a participação do simbiote nos mecanismos de ação do sistema imune (de SOUZA et al., 2009; de SOUZA et al., 2011; SINOTTE et al., 2018).

O gênero *Burkholderia* também tem sido alvo de pesquisas nesse tema. Em *A. sexdens*, a presença desse endossimbionte se mostrou importante na inibição do fungo patogênico *B. bassiana*, quando testado em ensaio microbiológico. Esse microrganismo também segrega compostos antimicrobianos que inibem a germinação de *M. anisopliae*, *Verticillium lecanii* e *E. weberi*. Os compostos cepacidina A e o lipopeptídico AFC-BC11 foram identificados como produtos dessa espécie bacteriana e estão relacionados à capacidade

desta bactéria de controlar infecções (LIM et al., 1994; KANG et al., 2004; SANTOS et al., 2006).

As bactérias lácticas também presentes em algumas espécies de formigas podem contribuir para o potencial defensivo da mesma. Essas bactérias secretam o ácido láctico, que modifica as condições do ambiente, acidificando-o e o tornando intolerável para outras bactérias e fungos, desempenhando, portanto, importante função contra patógenos. Esse papel de defesa pela produção de antimicrobianos ou mudança de pH foi sugerido em cupins cultivadores de fungo. *Lactobacillus* é um dos gêneros em que estão incluídas bactérias lácticas, ele foi encontrado em gêneros de formigas como *Mycocepurus*, *Polyhachis* e *Atta*, mas ainda tem sua função pouco elucidada nesses e em outros grupos (KELLNER et al., 2015; RAMALHO et al., 2017; VIEIRA et al., 2017).

A defesa mediada por simbioses foi o terceiro mecanismo com maior número de artigos, correspondendo a 17% do total (Figura 3). Os artigos que trataram desse subtema apresentam, principalmente, respostas defensivas relacionadas à melanização, encapsulação e secreção de antimicrobianos, que correspondem a 1%, 9% e 40% respectivamente do total analisado (Figura 4). Os principais métodos utilizados pelos autores foram: ensaio microbiológico (18%), análise química (15%) e biologia molecular (11%) (Figura 5). Esse é um tema de destaque no meio científico e as novas tecnologias de NGS têm contribuído para despertar o interesse acerca da comunidade bacteriana simbiote de diversos grupos de formigas, a função desses microrganismos quanto a nutrição e defesa, sua transmissão entre as gerações e como eles têm coevoluído para se manter nos gêneros de formigas.

#### **4.4. Defesa imune interna**

A defesa imune interna dos insetos, quando comparada ao sistema imunológico dos vertebrados, é considerada um sistema imune inato com células de defesa, enzimas e padrões que evoluíram com a pressão do ambiente. Em insetos pode ser dividida em defesa celular e humoral. Esses mecanismos são mediados através de várias vias de sinalização ainda pouco conhecidas, os hemócitos são os principais mediadores da defesa celular e participam de processos como fagocitose, encapsulamento e melanização. Técnicas como o silenciamento de genes de RNA de interferência possibilitaram a identificação de alguns receptores e moléculas de sinalização intracelular em estudos sobre o reconhecimento microbiano e ativação de hemócitos (MARMARAS; LAMPROPOULO, 2009; FELDHAAR; GROSS, 2008).

A defesa humoral inclui peptídeos antimicrobianos, cascatas que regulam a coagulação e melanização da hemolinfa e a produção de reativos intermediários como o sistema de profenoloxidase (proPO-AS). A enzima fenoloxidase (PO), produzida nesse sistema, tem amplo espectro de ação e tempo de resposta rápida sendo, portanto, um constituinte fundamental da defesa inata das formigas. As respostas de defesa humoral e celular parecem atuar de maneira coordenada com o sistema nervoso e, por isso, desempenham importante papel na regulação de respostas inflamatórias durante a infecção. Fatores ambientais modulam os investimentos em defesas imunes, os quais representam altos custos, principalmente dentre os insetos sociais (DÁVILA et al., 2015; LAVINE; STRAND, 2002).

A divisão em castas, a idade dos indivíduos e a estrutura social da colônia podem ser fatores determinantes na alteração do nível de atividade enzimática da PO ou na taxa de encapsulamento. Em formigas-cortadeiras, a vida em grupo apesar de não alterar os níveis de PO é considerada uma medida profilática de suma importância contra doenças. E os indivíduos mais suscetíveis ou os que estão mais expostos ao parasitismo tendem a apresentar maiores níveis de respostas inflamatórias. Indivíduos mais velhos, ou seja, imunosenescentes e operárias do jardim de fungo que realizam atividades internas no ninho apresentaram maiores taxas de PO ativo e de encapsulamento, respectivamente. Já os machos têm resposta imune de encapsulamento muito menor do que operárias e rainhas, o que sugere baixo investimento em imunidade em castas de curta duração. Isso demonstra que a atividade do indivíduo e sua longevidade podem modular as defesas imunes internas com respostas adaptativas (VAINIO et al., 2004; BAER et al., 2005; ARMITAGE; BOOMSMA, 2010; RIBEIRO et al., 2011).

A regulação do sistema imunológico é crucial para o bem-estar da colônia e eventos de reprodução também são estudados quanto a modulação desse mecanismo. Em colônias endogâmicas, aquelas em que há acasalamento entre aparentados, as taxas de encapsulamento são maiores em fêmeas reprodutivas (ginas) quando comparadas a fêmeas geradas sem endogamia. Esse efeito pode ser devido ao estresse genético da endogamia e demonstram que a composição genética afeta de forma efetiva as linhas de defesa celular. Em rainhas, dados de atividade enzimática da PO revelam que a regulação dos níveis de PO ativo pode variar em diferentes tecidos, o que é decorrente de uma resposta adaptativa evolutiva. Como por exemplo, em diferentes espécies de formigas não há produção de PO em órgão de armazenamento de esperma, o que possibilita o armazenamento desse conteúdo por toda vida

da formiga sem que haja uma reação imunitária de rejeição (VITIKAINEN; SUNDSTRÖM, 2011; DÁVILA et al., 2015).

Não há dúvidas que outras vias de regulação e fatores ambientais estão envolvidos na modulação do sistema imune inato das formigas. É possível perceber que a regulação das respostas imune depende da história de vida do indivíduo, suas interações sociais na colônia e sua longevidade. Além disso, é preciso salientar que a exposição repetitiva a um patógeno pode levar a aquisição de uma “memória imune celular” que melhora a resistência contra doenças e diminui o tempo de reação imune quando há uma re-infecção (BAER et al., 2005; KONRAD et al., 2012).

No método de busca utilizado apenas 8% dos trabalhos estavam relacionados ao mecanismo de defesa imune interno, verificamos que esse tema passou a ser abordado nas pesquisas científicas no final da década de 90 (Figura 2 e 3). Quanto as “respostas defensivas” encontradas para esse subtema em relação ao total de trabalhos 9% citou a taxa de encapsulação, 6% tratavam da enzima fenoloxidase e apenas 1% dos eventos de melanização (Figura 4). As principais metodologias utilizadas em artigos que tratam desse assunto são a inserção de fio de nylon e ensaios de atividade enzimática que correspondem à 9% e 4%, respectivamente, de todas as metodologias levantadas nessa análise (Figuras 5).

Os dados demonstram que ainda há poucos estudos que verificam a capacidade imunitária celular das formigas em comparação a outros mecanismos estudados. Muitos autores têm descrito esse sistema de defesa em insetos em geral, não em especialmente de formigas, estes não foram considerados nas porcentagens (LAVINE; STRAND, 2002; FELDHAAR; GROSS, 2008; MARMARAS; LAMPROPOULO, 2008; ARDIA et al., 2012; HARPUR; ZAIED, 2013).

#### **4.5. Ambiente do ninho**

Embora se saiba que as funções imunológicas dos insetos estão relacionadas com a condição corporal, condição ambiental, recursos alimentares e o micro-ambiente do ninho, a associação entre as variações externas e as repostas defensivas ainda é amplamente desconhecida. Um exemplo dessa associação é o efeito negativo do desmatamento da floresta na taxa de encapsulação de rainhas e operárias de *Formica aquilonia*, que indica que o estresse ambiental pode aumentar a suscetibilidade das formigas a doenças em habitats perturbados (SORVARI et al., 2008).

Para minimizar estresses bióticos e abióticos, as formigas-cortadeiras, por respostas comportamentais, escolhem locais adequados para alocação de seus ninhos. O ambiente

subterrâneo, onde estão alocados os ninhos dessas formigas, além de proteger seu fungo simbionte do estresse térmico e dessecativo, apresenta condições hipóxicas (baixo oxigênio) e hipercápnicas (alto dióxido de carbono). As rainhas fundadoras de colônias utilizam a concentração de CO<sub>2</sub> como sinal de orientação para selecionar locais adequados para o crescimento de seu fungo. Elas preferem níveis intermediários de CO<sub>2</sub>, entre 1 e 3%, evitando níveis atmosféricos e níveis elevados de CO<sub>2</sub>. Pode ser que essas condições, além de favorecer o crescimento do simbionte, evite a proliferação de microrganismos aeróbicos, já que se sabe que condições físico-químicas, como temperatura, pH, pressão atmosférica e concentração de gases, exercem influência no crescimento de microrganismo. Mas ainda pouco se conhece de como as formigas controlam essas condições e se fazem isso para evitar contaminações (RÖMER et al., 2017).

Em outro aspecto, a oferta de material no ambiente externo pode favorecer o estabelecimento de um ambiente livre de patógenos dentro do ninho. A formiga-da-madeira (*Formica paralugubris*) reduz a densidade de patógenos e protege suas colônias com a coleta de resina sólida de árvores coníferas, em que constrói seus ninhos. A presença de resina gera no ninho um ambiente desfavorável para a proliferação de microrganismos e, por isso, trata-se de uma medida de defesa profilática, ou seja, que previne a colônia contra doenças. Essa medicação coletiva, proveniente da coleta de resina, diminui a atividade antibacteriana individual das operárias, já que se trata de um eficiente mecanismo e permite reduzir o uso de outras frentes de defesa. O que foi mostrado pela atividade reduzida da profenoloxidase dessa espécie (CASTELLA et al., 2008).

Ainda quanto a coleta de materiais do ambiente externo que favorecem a estabilidade da colônia, é importante citar a capacidade das formigas de se automedicar, alterando suas preferências de forrageamento para incluir a ingestão de substâncias que possam melhorar a sobrevivência dos indivíduos e assepsia do ninho. *Formica fusca* aumenta o uso de espécies reativas de oxigênio (ROS) quando expostas a fungos patogênicos, antes da infecção real (medicação profilática) e após a infecção (automedicação terapêutica). O ROS ingerido é prejudicial ao parasita e esse efeito prejudicial aumenta a aptidão do hospedeiro, já que as formigas infectadas sobrevivem mais quando o ROS está presente em sua dieta. Isso se trata de um padrão comportamental adaptado para aumentar a resistência da colônia a doenças (BOS et al., 2015).

A categoria definida como ambiente do ninho foi o mecanismo de defesa que se obteve menor número de artigos durante o levantamento e representa apenas 2% do total (Figura 3). Isso porque os autores abordam principalmente a biologia, fisiologia e

comportamento das formigas e pouco abordam o sistema complexo de um formigueiro que, em algumas espécies, inclui o fungo simbiote. Espera-se que os trabalhos acerca do ambiente do ninho tratem das condições físico-químicas estabelecidas no interior da colônia e de como são mantidas pelos indivíduos e pelas associações desses com o ambiente externo e, por isso, mais estudos são necessários sobre o tema. Os métodos utilizados nos artigos selecionados para este tema foram estudo comportamental e inserção de fio de nylon que representam 25% e 8% do total, respectivamente. E as respostas defensivas estão relacionadas a encapsulação (9%) e dieta (2%) (Figuras 4 e 5).

#### **4.6. Outros mecanismos**

A categoria “outros mecanismos” reuniu artigos que tratam da defesa das formigas, mas que não se encaixam às categorias pré-estabelecidas na Tabela 1. Os trabalhos selecionados nessa categoria tratam da defesa relacionada a fatores da reprodução e da defesa química mediada por secreções que não são de glândulas exócrinas, que correspondem a 5% e 1% do total, respectivamente (Figura 3). Os métodos de pesquisa utilizados nesses estudos foram a inserção de fio de nylon, para verificar a taxa de encapsulação, análises químicas e estudos microbiológicos, que representam 9%, 15% e 18% do total, respectivamente (Figura 4 e 5).

A maioria dos estudos sobre sistema imune e mecanismos de defesa em formigas é realizado com operárias, mas alguns estudos demonstram que as castas reprodutivas (machos e fêmeas) apresentam respostas imunes variadas, como a expressão diferencial de genes envolvidos na defesa imunológica entre operárias, fêmeas reprodutoras e machos. Os machos apresentam resposta imune muito menor do que as operárias, sugerindo uma suscetibilidade haplóide ou redução do investimento na imunidade de machos que tem curta duração de vida (BAER et al., 2005; KOCH et al., 2013).

Algumas dessas variações na resposta imune podem estar diretamente relacionadas com eventos reprodutivos como, por exemplo, o armazenamento de espermatozoides que tem custo significativo e reduz a resposta de encapsulação em fêmeas reprodutoras após a fundação da colônia. Esse impacto causado pelo armazenamento do conteúdo na espermateca é maior quando mais machos depositam o esperma durante o acasalamento. Por outro lado, a endogamia (acasalamento entre indivíduos aparentados) provoca estresse genético alterando as taxas de encapsulamento em rainhas, de forma que a redução da diversidade genética compromete a estabilidade imunológica de toda a colônia. O “status” de acasalamento parece ter importância na resistência imune das fêmeas reprodutoras, que quando acasaladas

apresentam priming imunológico maior do que as não-acasaladas, o que sugere que o acasalamento desencadeia regulação do sistema imunológico (BAER et al., 2006; UGELVIG et al., 2010; VITIKAINEN; SUNDSTRÖM, 2011; GÁLVEZ; CHAPUISAT, 2014).

Durante o cultivo do fungo simbiote, as formigas-cortadeiras aplicam seu fluido fecal sobre o jardim de fungo e o substrato preparado para incorporação no jardim. O significado bioquímico desse comportamento foi associado a funções nutritivas, já que o material fecal contém enzimas proteolíticas que auxiliam na decomposição de polissacarídeos das plantas e componentes nitrogenados que facilita o crescimento inicial do fungo. Porém, foi mostrado que o líquido fecal de *Atta sexdens* tem efeito inibitório significativo na germinação de esporos de *Fusarium solani*. O que também já foi visto em cupins *Zootermopsis angusticollis*, em que o pellets fecais utilizados para construção dos ninhos exercem proteção bioquímica, reduzindo o risco de infecção fúngica (MARTIN, 1970; ROSENGAUS et al., 1998; RODRIGUES et al., 2008).

Os estudos conduzidos sobre o líquido fecal de espécies de formigas realizam análises químicas do conteúdo fecal e relacionam os componentes as funções. As formigas do gênero *Neivamyrmex* que possuem um “odor fecal” característico contém em seu líquido fecal o composto escatol, que inibe o crescimento da bactéria (*Escherichia coli*) e do fungo (*Aspergillus parasiticus*) em culturas de laboratório. Em *Solenopsis invicta* foi identificada a presença de ácido fosfórico no líquido fecal, composto que pode atuar na manutenção do pH do ambiente do ninho pela produção de sais ácidos, neutros e alcalinos (BROWN et al., 1979; CHEN et al., 2005). Pouco se sabe sobre o tema, mas é possível que a aplicação do material fecal no ninho seja um mecanismo alternativo de defesa e, por isso, mais estudos são necessários para desvendar o papel do líquido fecal em relação a defesa imune externa.

## 5. Considerações finais

Os temas explanados nessa revisão reúnem os conteúdos conhecidos no meio científico acerca dos mecanismos de defesa imune de diferentes espécies de formigas. As formigas, de maneira geral, combinam padrões comportamentais e características hereditárias para o estabelecimento de um ambiente livre de patógenos e o aumento da resistência de toda a colônia às doenças. Não se trata de um controle central contra patógenos e, sim, da participação de mecanismos individuais e sociais que exercem influência e se relacionam na manutenção de um ambiente asséptico no ninho. Nossos resultados apontam para uma carência de estudos com espécies de todas as subfamílias de Formicidae, uma vez que a maioria dos trabalhos foram realizados com Myrmicinae e Formicinae. Estudos comparativos

acerca dos mecanismos de defesa de diferentes espécies de formigas relacionando-os ao modo de vida dos indivíduos podem enriquecer os conhecimentos nessa área.

Além disso, os genes envolvidos nos processos imunológicos ainda representam uma lacuna no conhecimento científico sobre a defesa das formigas. Os avanços na tecnologia da biologia molecular possibilitam a realização de uma análise ampla dos genes relacionados a imunidade, para então associar a expressão desses genes às condições externas, comportamentos e o status reprodutivo.

O estudo da participação de secreções, que não as produzidas por glândulas exócrinas, também se mostra pertinente e pode gerar a descoberta de compostos produzidos durante processos metabólicos que apresentam potencial antimicrobiano e importante participação na assepsia do ninho. Sugerimos que futuras linhas de pesquisas busquem relacionar informações a nível celular e molecular à fisiologia e ecologia das formigas e seus patógenos, como a análise dos genes, das glândulas e dos comportamentos envolvidos aos mecanismos de defesa imunológica das formigas, para assim uma compreensão abrangente acerca do tema.

## Referências

- ARDIA, D. R.; GANTZ, J. E.; STREBEL, S. Costs of immunity in insects: an induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity. *Functional Ecology*, v. 26, n. 3, p. 732-739, 2012.
- ARMITAGE, S. A. O.; BOOMSMA, J. J. The effects of age and social interactions on innate immunity in a leaf-cutting ant. *J. of Insect Physiol.*, v. 56, n. 7, p. 780-787, 2010.
- BAER, B.; KRUG, A.; BOOMSMA, J. J.; HUGHES, W. O. H. Examination of the immune responses of males and workers of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator* and the effect of infection. *Insectes Sociaux*, v. 52, n. 3, p. 298-303, 2005.
- BAER, B.; ARMITAGE, S. A.; BOOMSMA, J. J. Sperm storage induces an immunity cost in ants. *Nature*, v. 441, n. 7095, p. 872, 2006.
- BOOMSMA, J. J., SCHMID-HEMPEL, P. & HUGHES, W. O. H. Life histories and parasite pressure across the major groups of social insects. *Insect Evol Ecol Proc R Entomol Soc*, v. 211, p. 139-175, 2005.
- BOS, N.; LEFEVRE, T.; JENSEN, A. B.; D'ETTORRE, P. Sick ants become unsociable. *J. of Evolut. Biol.*, v. 25, n. 2, p. 342-351, 2012.
- BOS, N.; SUNDSTRÖM, L.; FUCHS, S.; FREITAK, D. Ants medicate to fight disease. *Evolution*, v. 69, n. 11, p. 2979-2984, 2015.
- BOT, A. N.; ORTIUS-LECHNER, D.; FINSTER, K.; MAILE, R.; BOOMSMA, J. J. Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insec. Sociaux*, v. 49, n. 4, p. 363-370, 2002.
- BROUGH, E. J. The antimicrobial activity of the mandibular gland secretion of a formicine ant, *Calomyrmex* sp. (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 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).
- BROWN, C. A.; WATKINS II, J. F.; ELDRIDGE, D.W. Repression of Bacteria and Fungi by the Army Ant Secretion: Skatole. *J. da Soc. Entomol. Kansas*, v. 52, n. 1, p. 119-122, 1979.
- CASTELLA, G.; CHAPUISAT, M.; MORET, Y.; CHRISTE, P. The presence of conifer resin decreases the use of the immune system in wood ants. *Ecological Entomol.*, v. 33, n. 3, p. 408-412, 2008.
- CHEN, J. Excreção de Ácido Fosfórico por Formigas Vermelhas Importadas, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Environ. Entomol.*, v. 34, n. 5, p. 1009-1012, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ee/34.5.1009>
- CHEN, J.; RASHID, T.; FENG, G.; ZHAO, L.; OI, D. Defensive chemicals of tawny crazy ants, *Nylanderia fulva* (Hymenoptera: Formicidae) and their toxicity to red imported fire ants, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Toxicon*, v. 76, p. 160-166, 2013.

- 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.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. A patologia agrícola de jardins de formigas fúngicas. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 96, p. 7998-8002, 1999b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073 / pnas.96.14.7998>.
- CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E.; SCHULTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MUELLER, U. G.; SUNG, G.; SPATAFORA, J. W.; STRAUS, N. A. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science*, v. 299, n. 5605, p. 386-388, 2003.
- DALOZE, D.; KAISIN, M.; DETRAIN, C.; PASTEELS, J. M. Chemical defense in the three European species of *Crematogaster* ants. *Experientia*, v. 47, n. 10, p. 1082-1089, 1991.
- DÂNGELO, R. A. C.; DE SOUZA, D. J.; MENDES, T. D.; COUCEIRO, J. D. C.; LUCIA, T. M. C. D. *Actinomycetes* inhibit filamentous fungi from the cuticle of *Acromyrmex* leafcutter ants. *J. of Basic Microbiol.*, v. 56, n. 3, p. 229-237, 2016.
- DÁVILA, F.; CHÉRASSE, S.; BOOMSMA, J. J.; ARON, S. Ant sperm storage organs do not have phenoloxidase constitutive immune activity. *J. of Insect Physiol.*, v. 78, p. 9-14, 2015.
- DE LIMA MENDONÇA, A.; DA SILVA, C. E.; DE MESQUITA, F. L. T.; DA SILVA CAMPOS, R.; DO NASCIMENTO, R. R.; DE AZEVEDO XIMENES, E. C. P.; SANT'ANA, A. E. G. Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 95, n. 4, p. 295-303, 2009.
- DE SOUZA, D. J.; VAN VLAENDEREN, J.; MORET, Y.; LENOIR, A. Immune response affects ant trophallactic behaviour. *J. of Insect Physiol.*, v. 54, n. 5, p. 828-832, 2008.
- DE SOUZA, D. J.; BÉZIER, A.; DEPOIX, D.; DREZEN, J. M.; LENOIR, A. *Blochmannia* endosymbionts improve colony growth and immune defence in the ant *Camponotus fellah*. *BMC microbiology*, v. 9, n. 1, p. 29, 2009.
- DE SOUZA, D. J.; DEVERS, S.; LENOIR, A. *Blochmannia* endosymbionts and their host, the ant *Camponotus fellah*: cuticular hydrocarbons and melanization. *Comptes Rendus Biol.*, v. 334, n. 10, p. 737-741, 2011.
- DE SOUZA, D. J.; LENOIR, A.; KASUYA, M. C. M.; RIBEIRO, M. M. R.; DEVERS, S.; DA CRUZ COUCEIRO, J.; DELLA LUCIA, T. M. C. Ectosymbionts and immunity in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Brain, behav. and immun.*, v. 28, p. 182-187, 2013.
- DEGNAN, P. H.; MORAN, N. A. Diverse phage-encoded toxins in a protective insect endosymbiont. *Applied and Environ. Microbiol.*, v. 74, n. 21, p. 6782-6791, 2008.
- FEFFERMAN, N. H., TRANIELLO, J. F., ROSENGAUS, R. B., & CALLERI, D. V. Disease prevention and resistance in social insects: modeling the survival consequences of immunity,

hygienic behavior, and colony organization. *Behav. Ecology and Sociobiol.*, v. 61, n. 4, p. 565-577, 2007.

FELDHAAR, H; GROSS, R. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes and Infection*, v. 10, n. 9, p. 1082-1088, 2008.

GÁLVEZ, D.; CHAPUISAT, M. Immune priming and pathogen resistance in ant queens. *Ecol. and evolut.*, v. 4, n. 10, p. 1761-1767, 2014.

HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci.*, v. 106, n.12, p.4742–4746, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0812082106>

HAIFIG, S. S. V. *Natureza do parasitismo de Escovopsis e Escovopsioides sobre Leucoagaricus gongylophorus, fungos associados aos jardins de formigas cortadeiras*. 2014. 59 f. Dissertação - (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/110413>.

HAMILTON, C.; LEJEUNE, B. T.; & ROSENGAUS, R. B. Trophallaxis and prophylaxis: social immunity in the carpenter ant *Camponotus pennsylvanicus*. *Biol. letters*, v. 7, n. 1, p. 89-92, 2011.

HARPUR, B. A.; ZAYED, A. Accelerated evolution of innate immunity proteins in social insects: adaptive evolution or relaxed constraint?. *Mol. Biol. and Evol.*, v. 30, n. 7, p. 1665-1674, 2013.

HEINZE, J.; WALTER, B. Moribund ants leave their nests to die in social isolation. *Cur.Biol.*, v. 20, n. 3, p. 249-252, 2010.

HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M.; HETRU, C. Innate immunity in higher insects. *Curr. Opinion in Immunol.*, 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.

HUGHES, W. O. H.; EILENBERG, J; BOOMSMA, J. J. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, v. 269, p. 1811–1819, 2002. Disponível em: <https://doi.org/doi:10.1098/rspb.2002.2113>.

KANG, J. G.; SHIN, S. Y.; KIM, M. J.; BAJPAI, V.; MAHESHWARI, D. K.; KANG, S. C. Isolation and Anti-fungal Activities of 2-Hydroxymethyl-chroman-4-one Produced by *Burkholderia* sp. MSSP. *J. of Antibiotics*, v. 57, n. 11, p. 726-731, 2004.

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. fiv073, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv073>.

- KOCH, S. I.; GROH, K.; VOGEL, H.; HANNSON, B.S.; KLEINEIDAM, C. J., et al. Caste-Specific Expression Patterns of Immune Response and Chemosensory Related Genes in the Leaf-Cutting Ant, *Atta vollenweideri*. *PLoS one*, v. 8, n. 11, p. e81518, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0081518>
- 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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001300>
- LACERDA, F. G.; DELLA LUCIA, T. M. C.; DE SOUZA, O.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; DE SOUZA, L. M.; COUCEIRO, J. C.; DE SOUZA, D. J. Social interactions between fungus garden and external workers of *Atta sexdens* (Linnaeus) (Hymenoptera: Formicidae). *Italian Journal of Zoology*, v. 81, n. 2, p. 298-303, 2014.
- LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biol.*, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.
- LI, H.; SOSA-CALVO, B.; HORNA, J. H. A.; PUPO, M. T.; CLARDYD, J.; RABELING, C.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C.R. Convergent evolution of complex structures for antibacterial defensive symbiosis in fungus-farming ants. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 115, n. 42, p. 10720-10725, 2018.
- LIM, Y.; SUH, J. W.; KIM, S.; HYUN, B.; KIM, C.; LEE, C. H. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. *J. of Antibiotics*, v. 47, n. 12, p. 1406-1416, 1994.
- LOMBARDO, M. Access to mutualistic endosymbiotic microbes: an underappreciated benefit of group living. *Behav Ecol Sociobiol*, v. 62, p. 479-497, 2008.
- MARMARAS, V. J.; LAMPROPOULOU, M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular signalling*, v. 21, n. 2, p. 186-195, 2009.
- 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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2001000300010>.
- MARTIN, M. M. The Biochemical Basis of the Fungus-Attine Ant Symbiosis: A complex symbiosis is based upon integration of the carbon and nitrogen metabolisms of the two organisms. *Science*, v. 169, n. 3940, p. 16-20, 1970.
- MASCHWITZ, U.; HÖLLDOBLER, B. Der Kartonnestbau bei *Lasius fuliginosus* Latr. (Hym. Formicidae). *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, v. 66, n. 2, p. 176-189, 1970.
- MATTOSO, T. C.; MOREIRA, D. D.; SAMUELS, R. I. Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. *Biology Letters*, v. 8, n. 3, p. 461-464, 2012.

MEIRELLES, L. A.; MCFREDERICK, Q. S.; RODRIGUES, A.; MANTOVANI, J. D.; DE MELO RODOVALHO, C.; FERREIRA, H.; BACCI, M. Jr.; MUELLER, U. G. Bacterial microbiomes from vertically-transmitted fungal inocula of the leaf-cutting ant *Atta texana*. *Environ. Microbiol. reports*, v. 8, n. 5, p. 630-640, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.12415>

MOREIRA, D. D. O.; DÁTILLO, W.; MORAIS, V.; ERTHAL, M.; SILVA, C. P.; SAMUELS, R. I. Diet type modifies ingestion rates and trophallactic exchanges in leaf-cutting ants. *Entomol. Exp. Appl.*, v. 154, p. 45–52, 2015.

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

MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M. *Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus nomem invalidum*. *Mycotaxon*. v. 37, p. 191–195, 1990.

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.

OKUNO, M.; TSUJI, K.; SATO, H.; FUJISAKI, K. Plasticity of grooming behavior against entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the ant *Lasius japonicus*. *J. of Ethol.*, v. 30, n. 1, p. 23-27, 2012.

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

OTTI, O.; TRAGUST, S.; FELDHAAR, H. Unifying external and internal immune defences. *Trends in Ecol. & Evolut.*, v. 29, n. 11, p.625-634, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.09.002>

POULSEN, M.; BOT, A. N.; CURRIE, C. R.; NIELSEN, M. G.; BOOMSMA, J. J. Within-colony transmission and the cost of a mutualistic bacterium in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Funct. Ecol.*, v. 17, n. 2, p. 260-269, 2003.

POULSEN, M.; HUGHES, W. O. H.; BOOMSMA, J. J. Differential resistance and the importance of antibiotic production in *Acromyrmex echinatio* leaf-cutting ant castes towards the entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius*. *Insectes Sociaux*, v. 53, n. 3, p. 349-355, 2006.

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.

REBER, A.; PURCELL, J.; BUECHEL, S. D.; BURI, P.; CHAPUISAT, M. The expression and impact of antifungal grooming in ants. *J. of Evolut. Biol.*, v. 24, n. 5, p. 954-964, 2006.

REBER, A.; CHAPUISAT, M. No evidence for immune priming in ants exposed to a fungal pathogen. *PloS one*, v. 7, n. 4, p. e35372, 2012.

- RIBEIRO, M. M. R.; DE SOUZA, D. J.; GANDRA, L. C.; DELLA LUCIA, T. M. C. Immunocompetence and energetic metabolism in different groups of workers of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 58, n. 2, 2011.
- 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. of Microbiol.*, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000100016>.
- RÖMER, D.; BOLLAZZI, M.; ROCES, F. Carbon dioxide sensing in an obligate insect-fungus symbiosis: CO<sub>2</sub> preferences of leaf-cutting ants to rear their mutualistic fungus. *PLoS one*, v. 12, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174597>.
- ROSENGAUS, R. B.; MAXMEN, A. B.; COATES, L. E.; TRANIELLO, J. F. A. Disease resistance: a benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, v. 44, p. 125–134, 1998. Disponível em: <https://doi.org/doi:10.1007/s002650050523>.
- ROSENGAUS, R. B.; GULDINJAMES, M. R.; TRANIELLO, F. A. Inhibitory Effect of Termite Fecal Pellets on Fungal Spore Germination. *J. of Chemical Ecol.* v. 24, n. 10, p. 1697–1706, 1998.
- 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.
- ROSENGAUS, R. B.; MALAK, T., MACKINTOSH, C. Immune-priming in ant larvae: social immunity does not undermine individual immunity. *Biol Lett*, v. 9, n. 6, p. 20130563, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2013.0563>.
- 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>.
- SANTOS, A.V.; DILLON, R.J.; DILLON, V.M.; REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R. I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 239, n. 2, p. 319-323, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.09.005>.
- 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. *Ap. and Environ. Microbiol.*, v. 81, n. 16, p. 5527–5537, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00961-15>
- SCHNEIDER, D. S.; CHAMBERS, M. C. Rogue insect immunity. *Science*, v. 322, n. 5905, p. 1199-1200, 2008.

SCHOENIAN, I.; SPITELLER, M.; GHASTE, M.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci.*, v. 108, n. 5, p. 1955-1960, 2011.

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

SEIPKE, R. F.; BARKE, J.; BREARLEY, C.; HILL, L.; DOUGLAS, W. Y.; GOSS, R. J.; HUTCHINGS, M. I. A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS one*, v. 6, n. 8, p. e22028, 2011.

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. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci.*, v. 9, n. 106, p. 17805-17810, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0904827106>

SERRÃO, J., de SOUZA, D., DELLA LUCIA, T., de SOUZA, L., LACERDA, F., & CECON, P. Morphometry of the metapleural gland of workers engaged in different behavioral tasks in the ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Animal Biology*, v. 60, n. 2, p. 229-236, 2010.

SINOTTE, V.; FREEDMAN, S.; UGELVIG, L.; SEID, M. *Camponotus floridanus* Ants Incur a Trade-Off between Phenotypic Development and Pathogen Susceptibility from Their Mutualistic Endosymbiont *Blochmannia*. *Insects*, v. 9, n. 2, p. 58, 2018.

SORVARI, J.; HAKKARAINEN, H.; RANTALA, M. J. Immune defense of ants is associated with changes in habitat characteristics. *Environm.l Entomol.*, v. 37, n. 1, p. 51-56, 2008.

TAERUM, S. J.; CAFARO, M. J.; LITTLE, A. E.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R. Low host–pathogen specificity in the leaf-cutting ant–microbe symbiosis. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, v. 274, n. 1621, p. 1971-1978, 2007.

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. *Cur. Biol.*, v. 23, n. 1, p. 76-82, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.034>.

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

TRANIELLO, J. F. A.; ROSENGAUS, R. B.; SAVOIE, K. The development of immunity in a social insect: evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 99, p. 6838 –6842, 2002. Disponível em: <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.102176599>.

TRANter, C.; GRAYSTOCK, P.; SHAW, C.; LOPES, J. F. S.; HUGHES, W. O. H. Sanitizing the fortress: protection of ant brood and nest material by worker antibiotics. *Behav. Ecology and Sociobiol.*, v. 68, n. 3, p. 499-507, 2014.

- TRANTER, C.; HUGHES, W. O. H. Acid, silk and grooming: alternative strategies in social immunity in ants?. *Behav. Ecology and Sociobiol.*, v. 69, n. 10, p. 1687-1699, 2015.
- TRANTER, C.; FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; HUGHES, W. O. Quality and quantity: transitions in antimicrobial gland use for parasite defense. *Ecol. and evolution*, v. 24, n. 5, p. 5857-5868, 2015.
- UGELVIG, L. V.; CREMER, S. Social prophylaxis: group interaction promotes collective immunity in ant colonies. *Curr. Biol.*, v. 17, p. 1967-1971, 2007. Disponível em: [https://doi.org/ doi:10.1016/j.cub.2007.10.029](https://doi.org/doi:10.1016/j.cub.2007.10.029).
- UGELVIG, L. V.; KRONAUER, D. J.; SCHREMPF, A.; HEINZE, J.; CREMER, S. Rapid anti-pathogen response in ant societies relies on high genetic diversity. *Proc. Biol. Sci.*, v. 277, n. 1695, p. 2821-2828, 2010.
- VAINIO, L.; HAKKARAINEN, H.; RANTALA, M. J.; SORVARI, J. Individual variation in immune function in the ant *Formica exsecta*; effects of the nest, body size and sex. *Evolut. Ecol.*, v. 18, n. 1, p. 75-84, 2004.
- VAUTRIN, E.; GENIEYS, S.; CHARLES, S.; VAVRE, F. Do vertically transmitted symbionts co-existing in a single host compete or cooperate? A modelling approach. *J Evol Biol*, v. 21, p. 145-161, 2008.
- 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.
- VITIKAINEN, E.; SUNDSTRÖM, L. Inbreeding and caste-specific variation in immune defence in the ant *Formica exsecta*. *Behav. Ecol. and Sociobiol.*, v. 65, n. 5, p. 899-907, 2011.
- YEK, S. H.; NASH, D. R.; JENSEN, A. B.; & BOOMSMA, J. J. Regulation and specificity of antifungal metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Proc. R. Soc. B.*, rspb20121458, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2012.1458>.
- YOUNGSTEADT, E. All That Makes Fungus Gardens Grow. *Science*, v. 320, n. 5879, p. 1006-1007, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.320.5879.1006>
- ZIENTZ, E.; FELDHAAR, H.; STOLL, S.; GROSS, R. Insights into the microbial world associated with ants. *Arch. of Microbiol.*, v. 184, n. 4, p. 199-206, 2005.

## *Capítulo 2*

### *Secreções das formigas-cortadeiras e a defesa da colônia*

## RESUMO

As formigas-cortadeiras cultivadoras de fungo do gênero *Atta* e *Acromyrmex* são herbívoros dominantes na Região Neotropical e comumente encontradas em áreas agrícolas, onde ocasionam grandes perdas econômicas devido a atividade de corte de folhas. A coleta de material vegetal possibilita o cultivo de seu fungo simbiote, que é fonte alimentar da colônia. O desafio de realizar o controle biológico dessas formigas é devido principalmente a sua capacidade de reconhecer e remover patógenos do jardim de fungo e de seus companheiros de colônia. Para isso, elas combinam diferentes mecanismos de defesa que são: a defesa interna (inata e adquirida) e a defesa externa (física e química). A presente pesquisa investigou a defesa externa química mediada pelas secreções da glândula mandibular e do líquido fecal de *Atta sexdens*. Os resultados indicam que essas secreções participam direta ou indiretamente da capacidade defensiva da colônia dessa espécie de formiga. Isso porque, quando presentes as secreções alteraram a taxa de germinação de fungos patógenos e antagonistas. A secreção da glândula mandibular se mostrou mais eficiente na inibição dos esporos fúngicos, já que inibiu totalmente a germinação de quatro dos cinco fungos avaliados. O líquido fecal, apesar de pouco alterar a taxa de germinação dos esporos fúngicos, é frequentemente depositado no jardim de fungo e a sua deposição pode colaborar para assepsia do ninho. Compostos com capacidade antimicrobiana como o agente oxidante peróxido de hidrogênio e o ácido láctico foram identificados nas amostras de líquido fecal e do jardim de fungo e podem estar relacionados ao estabelecimento de um microambiente asséptico e tamponado no ninho. Também foi verificada a presença do peróxido de hidrogênio na secreção da glândula mandibular e é possível que essa secreção exerça papel de antisséptico em locais contaminados, inativando os microrganismos e reduzindo a infecção. Vários outros fatores, internos e externos, podem ser associados à capacidade imunológica das formigas-cortadeiras. Estudos adicionais que envolvam a análise química dos peptídeos antimicrobianos dessas e outras secreções podem contribuir para o esclarecimento das estratégias defensivas adquiridas pelas formigas.

Palavras-chave: agentes antimicrobianos, defesa química, líquido fecal, glândula mandibular, assepsia.

## 1. Introdução

As formigas-cortadeiras coletam diversos materiais vegetais que são substrato para o cultivo de seu fungo simbiote. A intensa atividade de corte de folhas ocasionada por essas formigas em lavouras as caracterizam como pragas agrícolas, e muitos estudos têm sido realizados na busca de métodos eficazes no controle de formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. Elas são consideradas de difícil controle devido aos mecanismos fisiológicos e comportamentais que lhes permitem resistir à ação de diferentes métodos de combate, dentre outros fatores. Até o momento, o controle químico é o mais utilizado por apresentar resultados rápidos e eficazes, porém alguns inseticidas (como os organoclorados) foram proibidos em países da América Latina por causa de sua toxicidade não seletiva (MARINHO et al. 2006; GIRALDO-ECHEVERRI, 2009; MONTOYA-LERMA et al., 2012; DELLA LUCIA, 2014).

Dentre as alternativas ao controle químico está o controle biológico, realizado com o uso de microrganismos entomopatogênicos e formulação de iscas tóxicas combinadas de extratos de plantas e agentes patogênicos. Apesar de se tratar de um método de controle em crescente no controle de pragas, principalmente para outros insetos, eles não têm se mostrado eficazes no combate às formigas-cortadeiras. A principal limitação do controle biológico é a capacidade das formigas-cortadeiras de detectar e se recuperar contra agentes patógenos em condições naturais (BOARETTO; FORTI, 1997; ALMEIDA et al., 2007; MONTOYA-LERMA et al., 2012).

Para se defender de patógenos tanto no corpo como no ninho, as formigas combinam diferentes padrões defensivos. Dentre os mecanismos de defesa desses insetos ocorre a produção de antibióticos por actinomicetos da cutícula e a secreção de compostos antimicrobianos advindos de glândulas exócrinas, como a metapleuraleal e a ácida. Os comportamentos de limpeza entre os indivíduos da colônia e de assepsia do ninho também contribuem para a resistência do grupo a doenças. Discute-se se há outros mecanismos que ajudam a manter a estabilidade da colônia por longo período de tempo e que criam um microambiente peculiar no ninho com ótimas condições para a vida em sociedade, excluindo a presença de patógenos antagonistas (SCHULTZ, 1999; MUELLER et al., 2001; TRAGUST et al., 2013; OTTI et al., 2014).

Os mecanismos complementares de defesa podem estar relacionados a secreções produzidas pelas formigas-cortadeiras que estão em contato direto com o jardim de fungo, como o líquido fecal e a secreção da glândula mandibular. O líquido fecal, produto dos

processos digestivos, é armazenado no lúmen retal de formigas-cortadeiras e apresenta uma variedade de atividades enzimáticas, como a alfa-glucosidase (ERTHAL et al., 2004), e enzimas hidrolíticas que, quando depositadas no jardim de fungo, auxiliam na decomposição de polissacarídeos das plantas e poderiam atuar como barreira defensiva contra fungos antagonistas (MARTIN et al., 1970; RODRIGUES et al., 2008).

A secreção das glândulas mandibulares é conhecida por conter importantes feromônios como o de alarme e de reconhecimento da colônia (HERNÁNDEZ et al., 2002), porém pelo fato de estarem localizadas próximas a mandíbula, estrutura utilizada no corte de folhas e na incorporação do material vegetal no fungo simbiote, alguns estudos investigam propriedades antimicrobianas presentes na secreção. A remoção física de patógenos, realizada com uso da mandíbula e da glossa durante a atividade de “grooming”, também pode ser associada com a aplicação da secreção da glândula mandibular sobre os indivíduos e o fungo simbiote contaminado (MARSARO et al., 2001; RODRIGUES et al., 2008).

Por esses motivos, justifica-se que a realização de estudos adicionais sobre os mecanismos complementares de defesa das formigas-cortadeiras pode trazer avanços sobre o atual conhecimento acerca da defesa imune externa desempenhada por esses insetos. A investigação do potencial defensivo de secreções que são depositadas no ninho, como as secreções da glândula mandibular e do líquido fecal, pode esclarecer as estratégias utilizadas pelas formigas-cortadeiras contra fungos patogênicos invasores e sua capacidade imunológica individual e social.

## **2. Objetivos**

A presente pesquisa teve por objetivo investigar o potencial defensivo de secreções da formiga-cortadeira *Atta sexdens*. Para tal, o líquido fecal e a secreção da glândula mandibular foram analisados para verificar se os compostos presentes colaboram para o estabelecimento de um ambiente livre de patógenos no ninho. Especificamente, buscou-se:

1- Analisar se as secreções da glândula mandibular das formigas e o líquido fecal são capazes de inibir *in vitro* a germinação de fungos patogênicos.

2- Investigar a presença nas secreções de compostos secundários do metabolismo que atuam na manutenção do pH e para o estabelecimento de um microambiente asséptico no interior dos ninhos.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Coleta da espécie

As operárias médias de *A. sexdens* utilizadas nos experimentos, foram coletadas de uma colônia de treze anos mantida no Laboratório de Formigas-cortadeiras do Centro de Estudos de Insetos Sociais do Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro – UNESP Rio Claro – SP. A colônia possui aproximadamente 130 litros de jardim de fungo e é alimentada com folhas de *Eucalyptus* sp., *Hibiscus* sp., *Mangifera indica* e aveia.

#### 3.2. Teste de inibição de fungos

A fim de verificar o potencial antimicrobiano da secreção da glândula mandibular (SGM) e do líquido fecal (LF), testamos *in vitro* o efeito desses compostos na germinação de cinco fungos patogênicos e/ou antagonista do fungo mutualista das formigas: *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *T. harzianum*, *Syncephalastrum* sp. e *Escovopsis* sp. Para isso, as secreções foram coletadas de 150 operárias de tamanho médio e preparadas três concentrações a partir de sua diluição em água destilada: D1: “in natura”; D2: diluição 50% de D1; D3: diluição 50% de D2, D2 e D3, sendo, portanto, D1 a amostra mais concentrada.

Para obtenção da secreção da glândula mandibular as operárias tiveram suas cabeças dissecadas com pinças entomológicas e a secreção foi coletada com o auxílio de uma micropipeta. Para obtenção do líquido fecal, as formigas tiveram seus gásteres levemente pressionados por uma pinça até a eliminação da gota fecal que foi coletada com uso de uma micropipeta (RODRIGUES et al., 2008). As amostras de 150 operárias foram dissolvidas em 1000  $\mu$ L de água destilada e sofreram diluição seriada (1:1) para obtenção das outras concentrações. Essas amostras foram armazenadas em geladeira, protegidas da luz e foram extraídas no máximo um dia antes da montagem do bioensaio.

As amostras foram filtradas com membrana filtrante de 0,22  $\mu$ m Millex® antes de receberem os esporos fúngicos. A suspensão de esporos com concentração  $6 \times 10^6$  foi preparada nas amostras de LF e SGM, com exceção do controle em que se utilizou água destilada. A contagem de esporos se deu com uso da câmara de Neubauer. Após o preparo da suspensão de esporos, essa foi submetida a filtração utilizando-se de uma pipeta de vidro de 10 mL e algodão estéril, a fim de retirar as hifas dos fungos e garantir que apenas os esporos fossem utilizados no ensaio. As amostras contendo os esporos foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente e protegidas da luz.

Posteriormente, alíquotas de 150  $\mu\text{L}$  da suspensão de esporos foi semeada em placas contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) para todos os fungos, com exceção do *Escovopsis* sp. que mostrou ter melhor crescimento em meio ágar malte e por isso optou-se por utilizar esse meio para cultura desse fungo. As amostras foram espalhadas em placas de cultivo com uso da alça de Drigalsk pelo método esgotamento e em triplicatas. As placas foram mantidas em B.O.D a 25°C antes de serem fotografadas no microscópio invertido Primovert Zeiss® para contagem dos esporos. Para garantir distribuição aleatória das fotos, cada placa foi dividida em seis partes e de cada parte foram fotografadas duas regiões, totalizando 12 fotografias por placa.

Um ensaio piloto foi conduzido anteriormente para determinar o tempo de germinação em meio sólido para todos os fungos utilizados. Nesse ensaio a suspensão de esporos  $6 \times 10^6$  em água destilada também foi filtrada com pipeta de vidro contendo algodão estéril, a fim de manter apenas os esporos fúngicos. As placas com meio de cultura contendo a suspensão foram mantidas em B.O.D a 25°C e observadas periodicamente em microscópio invertido até o início da germinação dos esporos. O tempo necessário para início da germinação dos esporos dos diferentes fungos foi de 8 horas, 12 horas, 16 horas, 17 horas e 48 horas para *T. harzianum*, *M. anisopliae*, *Syncephalastrum* sp., *B. bassiana* e *Escovopsis* sp., respectivamente.

Para análise da taxa de germinação dos fungos, foram utilizadas 12 fotografias por placa, obtidas no microscópio invertido, para contagem dos esporos germinados (EG) e não-germinados (EN). Foram considerados germinados os esporos que continham início do crescimento de hifas (Figura 4). Foi determinado um índice de germinação para cada tratamento utilizando a seguinte equação:

$$IG = \frac{EG}{EG + EN}$$

### 3.3. Análise da presença de peróxido de hidrogênio

Nesse item estão agrupados os ensaios realizados para quantificação do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Esse composto inorgânico, metabólito natural na maioria dos organismos, é receptor de elétrons durante a reação de peroxidação, mediada pela enzima peroxidase. A peroxidase participa da oxidorredução dos ácidos graxos de cadeia curta removendo os átomos de  $\text{H}^+$ , os quais são transferidos para o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$  por apresentar oxigênio reativo é danoso a célula e, por isso, eficiente na inativação de microrganismos (ALBERTS et al.,

2010; VIEIRA; BUENO, 2014). A presença de peróxido, um agente oxidante, em grande quantidade no organismo da formiga pode favorecer sua defesa contra patógenos e resistência a doenças (BOS et al., 2015) e por isso, esse componente foi investigado na presente pesquisa.

Os ensaios foram conduzidos com amostras da secreção da glândula mandibular, líquido fecal e fungo simbiote *Leucogaricus gongylophorus*. As operárias tiveram suas cabeças dissecadas para coleta da secreção da glândula mandibular (SGM) e para obtenção do líquido fecal (LF), os gásteres das operárias foram levemente pressionados com uma pinça estéril e a gota fecal coletada com uso de uma micropipeta, seguindo recomendações de Rodrigues et al. (2008). No ensaio em que utilizamos o fungo simbiote *L. gongylophorus* (colorimétrico), duas amostras foram consideradas: a esponja de fungo retirada das painelas do formigueiro (FF) e o cultivo do fungo em placa com meio ágar aveia (FP).

### 3.3.1. Teste colorimétrico

As amostras foram submetidas ao teste colorimétrico MQuant® Peroxide Test (cat. 1.10011.0001) para quantificação do peróxido de hidrogênio. Nesse método a peroxidase, contida na tira de teste, quando inserida na amostra transfere o oxigênio do peróxido a um indicador redox orgânico, formando-se um produto de oxidação de cor azul. A concentração de peróxido se determina semi-quantitativamente por comparação visual da zona de reação da tira de teste com zonas de uma escala colorimétrica. O intervalo de medição está entre 0,5 e 25 mg/l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Uma amostra controle foi utilizada seguindo recomendações do folheto de informações sobre o produto: medimos 5 mL de Perhydrol® (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) diluído em água destilada, o valor determinado pelo teste foi de 10 mg/l, como esperado.

Todas as amostras (SGM, LF, FF e FP) que foram submetidas a esse teste estavam diluídas em água destilada e foram medidas em triplicatas. O LF e SGM coletados de 100 operárias foram diluídos em 1 mL de água destilada e medidos com a tira de teste logo em seguida. Para preparo da amostra FF foi determinado um volume de coleta da massa de fungo equivalente a 10 mL (em um béquer) que foi diluída em 10 mL de água destilada e homogenizada. A amostra FP foi coletada com alça descartável estéril e diluída 1:1 em água destilada. Medimos também amostras do jardim de fungo após contaminação do formigueiro em duas condições: contaminação por *Escovopsis* sp. (não induzida) e contaminação por carregamento de iscas tóxicas oferecidas na panela de alimentação.

Todo procedimento de preparação das amostras e medição foi realizado em ambiente protegido da luz, para evitar degradação do peróxido de hidrogênio. O pH das amostras

também foi avaliado durante o ensaio, com uso do teste colorimétrico McolorHast® pH-indicator strips (Merck).

### 3.3.2. Kits de análise enzimática

As amostras LF e SGM de 100 operárias foram diluídas em água destilada e preparadas segundo protocolo do fabricante dos kits enzimáticos: Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (cat. A22188 Invitrogen) e Spectroquant® Hydrogen Peroxide Test (cat. 1.18789.0001 Merck). Apesar do primeiro kit de análise (Amplex Red) possibilitar a quantificação de peroxidase, apenas o peróxido de hidrogênio foi quantificado nessa etapa metodológica, uma vez que a atividade enzimática da peroxidase nas secreções das formigas não foi alvo de estudo.

Para quantificação do peróxido de hidrogênio contido nas amostras, uma curva padrão foi preparada utilizando os produtos presentes nos kits de análise. Cinquenta microlitro das amostras foi utilizado para o ensaio em placas de 96 poços e cada amostra foi lida em triplicata, a fim de reduzir erros de medição. Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante em espectrofotômetro Infinite 200 Pro Tecan quando utilizamos o Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (530-560 nm) e no espectrofotômetro BioTrak II Amersham Bioscience quando utilizamos o Spectroquant® Hydrogen Peroxide Test (445-485 nm). Todo procedimento de preparação foi realizado mantendo as amostras em temperatura ambiente e protegidas da luz, para minimizar a degradação de peróxido de hidrogênio.

O líquido fecal de 100 operárias médias, coletado segundo método descrito e diluído em 100 µL de água destilada, apresentou valor de absorbância baixo quando submetida a leitura por espectrofotômetro. Isso porque, a alta concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nessa amostra saturou a enzima da solução de trabalho do kit de análise e não pôde ser inserida no intervalo de leitura do equipamento. Para comprovar essa hipótese, realizamos uma diluição seriada da amostra de líquido fecal até encontrar o valor ótimo que está dentro do intervalo de leitura. Outros ensaios revelaram que esse valor ótimo corresponde a quantidade de amostra de 10 operárias. Portanto, os ensaios enzimáticos foram realizados com amostras do líquido fecal de 10 formigas. O número de operárias utilizadas para coleta da glândula mandibular foi mantido (100 operárias), já que a concentração nessa amostra está dentro do intervalo de leitura.

Os dados foram submetidos a uma análise de regressão e os valores de absorbância foram quantificados em mg/l, utilizando equação da reta ( $R^2 = 0,998$ ) proveniente das curvas padrões dos produtos utilizados.

### 3.4. Análise da presença de ácido láctico

Esta análise foi realizada para identificação de um composto orgânico, o ácido láctico, nas amostras do líquido fecal (LF) e do fungo simbiote *L. gongylophorus* em duas condições: retirado do jardim de fungo de um formigueiro ativo (FF) e cultivado em placa de cultura com meio ágar aveia (FP). O ácido láctico pode apresentar atividade antimicrobiana, já em sua forma não dissociada é capaz de atravessar a membrana celular microbiana reduzindo o pH intracelular, o que irá interferir com importantes funções metabólicas como a translocação de substratos e a fosforilação oxidativa (BARBOSA et al., 2011).

Utilizamos a técnica de cromatografia gasosa para identificação desse composto nas amostras. A análise de amostras do fungo simbiote em duas condições objetivou investigar se esse composto está presente no ninho devido a deposição de líquido fecal no jardim de fungo, ou se o fungo *L. gongylophorus* também produz o ácido láctico. As amostras do fungo foram coletadas, tanto do jardim quanto da placa de cultivo, e diluídas em 1 mL de água destilada. O líquido fecal de 100 formigas foi coletado e diluído também em 1 mL de água destilada.

Para uso de amostras líquidas na cromatografia gasosa é necessário que essas sejam totalmente volatilizadas dentro da coluna. Analitos no estado gasoso, a partir de amostras líquidas, podem ser gerados a partir de técnicas de derivatização. A derivatização por BSTFA adiciona grupos trimetilsilil, substituindo os hidrogênios nas hidroxilas. Os oxigênios, como são mais estáveis, é difícil retirar o hidrogênio da molécula, mas quando adicionamos esses grupos maiores, essas ligações são quebradas mais facilmente (CAMPOS; GRIMBERG, 2001; SCHUMMER et al., 2009).

#### 3.4.1. Derivatização por BSTFA

Em um tubo de microrreação (1 mL) foram adicionados 80µL de amostra (LF, FF e FP) previamente diluída em água, essas foram secas em estufa a 82°C por aproximadamente 3 horas. Depois de secas, foram adicionados 100µL de BSTFA + TCMS 1% (Sigma-Aldrich) e 60µL de acetonitrila (catalisador da reação). Os tubos foram fechados e mantidos em estufa à 60°C por 30 min. Após este período, as amostras foram retiradas e resfriadas a temperatura ambiente. O volume foi completado para 1mL com acetona e posteriormente filtrado em filtro de PTFE 22,0 µm em seringa de plástico de volume 3,0 mL para um vial de 1,5 mL.

Para a análise das soluções obtidas na etapa de preparo de amostras foi injetado 1 µL de amostra em uma coluna Rtx-5 MS (5% difenil / 95% dimetil polisiloxano; 30,00m ×

0,25mm id × 0,25 µm de recobrimento; Restek, Bellefonte, PA, EUA) no Cromatógrafo a Gás Shimadzu 2010 AF-Plus com injetor AOC-5000 e detector Espectrômetro de Massas Sequencial TQ-8040 (CG-EM/EM), o qual foi programado com os parâmetros de gradiente de temperatura apresentados na Tabela 1.

O modo de ionização selecionado foi ionização por elétrons operando com uma energia de 70 eV. O detector de massas foi programado para registrar os espectros no modo SIM (Q3) com os íons selecionados 117 e 147, a partir de 3,0 min. A escolha do método SIM (“selected ion monitoring”) se deu pelo fato da amostra vir de uma matriz complexa, ou seja, possuir diversos compostos que podem interferir na análise e diminuir o sinal do analito, que é o nosso composto de interesse. Os íons selecionados foram escolhidos por comparação com os íons mais intensos em amostra padrão de ácido lático (Figura 1).

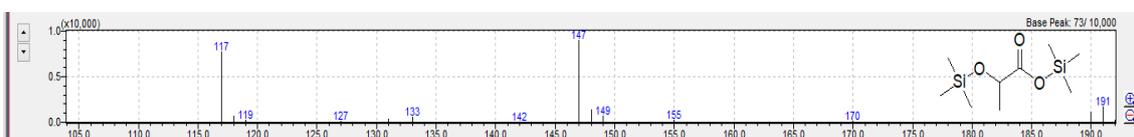
Tabela 1 - Parâmetros de temperatura definidos no cromatógrafo a gás.

Temperatura (°C)	
Auto Injetor	280
Fonte de íons	290
Interface	290
<i>Split</i>	1:5
Vazão de He (mL.min <sup>-1</sup> )	1,00

Taxa (°C.min <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
-	70	4
25	290	1
Tempo total do programa (min)		13,80

Figura 1 - Picos selecionados para análise cromatográfica a partir do padrão de ácido lático.



### 3.4.2. Análise de dados

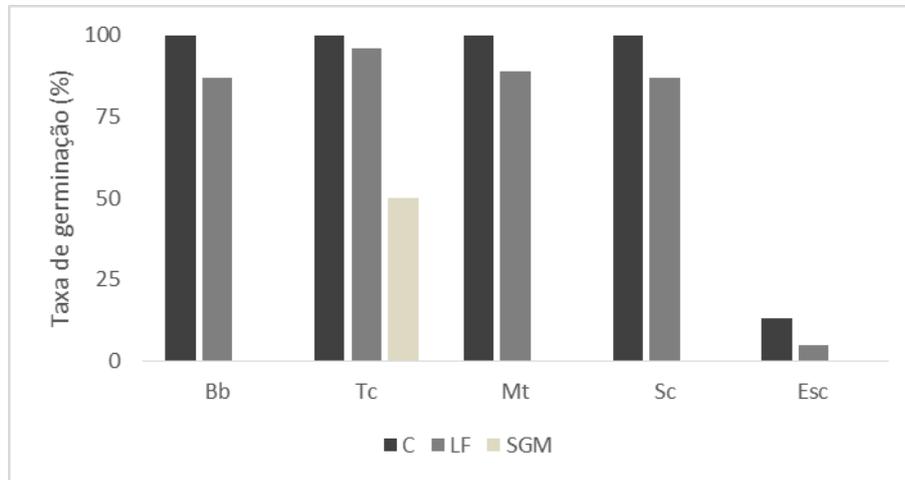
Os dados obtidos nos cromatogramas foram analisados comparando-se o percentual do composto de interesse em relação ao total de compostos presentes em cada amostra (abundância relativa) e, também comparando o valor de ácido láctico presente em cada amostra a partir da injeção de um padrão interno (proporção por amostra). Para o cálculo da proporção do ácido láctico por amostra, utilizou-se o mentol como padrão interno, o qual não está presente nas amostras de LF, FF e FP. A adição de um padrão interno de concentração conhecida normaliza a área do analito e possibilita comparar proporcionalmente a área do pico obtido para o padrão interno (mentol) e a área dos picos obtidos para as amostras. Foram utilizados nessa análise 10 $\mu$ L de amostra, 60 $\mu$ L de piridina e 100 $\mu$ L de BSTFA e mentol na concentração 1 ppm, os parâmetros utilizados no cromatógrafo foram os mesmos descritos no item 3.4.1. Os tempos de retenção foram 6,6 min para o ácido láctico e 8,4 min para o mentol.

## 4. Resultados

### 4.1. Testes de inibição de fungos

Os valores da contagem dos esporos germinados em placa sugerem que as amostras LF e SGM alteram o índice de germinação de todos os fungos, inibindo a germinação de esporos. Em todos os fungos testados SGM foi mais eficiente na inibição de esporos. A SGM na diluição D1 apresentou melhores resultados e inibiu completamente, em quatro fungos, a germinação de esporos. Em alguns fungos, o LF pouco interferiu a germinação fúngica, atingindo 96% de germinação no *T. harzianum* na concentração D1; em outros fungos como *B. bassiana* a taxa foi menor nessa concentração, de 87% (Figura 2).

Figura 2 - Taxa de germinação dos esporos (%) das cinco espécies de fungos selecionadas para tratamento com secreção do líquido fecal (LF – D1) e glândula mandibular (SGM – D1) de *Atta sexdens*. C: controle. Bb: *Beauveria bassiana*; Tc: *Trichoderma harzianum*; Mt: *Metarhizium anisopliae*; Sc: *Syncephalastrum* sp.; Esc: *Escovopsis* sp.



A Tabela 2 apresenta os valores de IG obtidos nos tratamentos com LF e com SGM nas três diluições testadas. O IG calculado para D3 de LF e SGM foram próximos ao controle, com exceção de *B. bassiana* que, mesmo na amostra mais diluída de SGM, apresentou 76% de germinação. *T. harzianum* é, dentre os fungos selecionados, o que menos sofreu inibição na germinação de esporos tanto com LF quanto com SGM. Já o *Escovopsis* sp. foi o que apresentou a maior redução dos valores de IG, tanto no tratamento com LF quanto com a SGM, em todas as concentrações (Figura 2).

O *Escovopsis* sp. apresenta baixo índice de germinação quando cultivado em meio de cultura (ZAMUNÉR, 2015; REYNOLDS; CURRIE, 2004; CURRIE et al., 1999a) e por isso testes preliminares foram realizados para definir a taxa de germinação desse fungo, que foi cerca de 10%. Para análise dos dados desse fungo consideramos como germinação máxima o valor encontrado no controle de 13% (equivalente a 100% de germinação). Assim, os valores de IG para as placas tratadas com LF e SGM foram calculados considerando 100% de germinação no grupo controle.

Tabela 2 - Índice de germinação (IG) dos cinco fungos analisados. 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.

IG (%)	<i>B. bassiana</i>		<i>T. harzianum</i>		<i>M. anisopliae</i>		<i>Syncephalastrum</i> sp.		<i>Escovopsis</i> sp.	
	LF	SGM	LF	SGM	LF	SGM	LF	SGM	LF	SGM
D1	87	0	96	50	89	0	87	0	43	0
D2	100	39	100	86	93	58	92	67	64	5
D3	100	76	100	96	97	96	99	90	79	24
C	100		100		100		100		100	

A inibição da germinação de esporos foi maior a medida que utilizamos maiores concentrações de LF e SGM. O padrão de inibição não diferiu graficamente entre os fungos e por isso apenas a curva construída com os dados de *B. bassiana* é apresentada (Figura 3). As imagens obtidas em microscópio invertido possibilitam visualizar a modificação no padrão de germinação dos esporos entre os tratamentos (C, LF e SGM) e entre os fungos selecionados (Figura 4) e, também, é possível notar a diferença morfológica dos esporos dos diferentes fungos. É preciso salientar que a contagem total de EG e EN foi realizada somando-se os valores das 12 fotos de cada placa.

Figura 3 - Curva de inibição da germinação de esporos de *Beauveria bassiana* após tratamento com secreção do líquido fecal (LF) e glândula mandibular (GM) de *Atta sexdens*. Eixo x: três diluições e o controle (valores das concentrações em logaritmo); Eixo y: índice de germinação (IG).

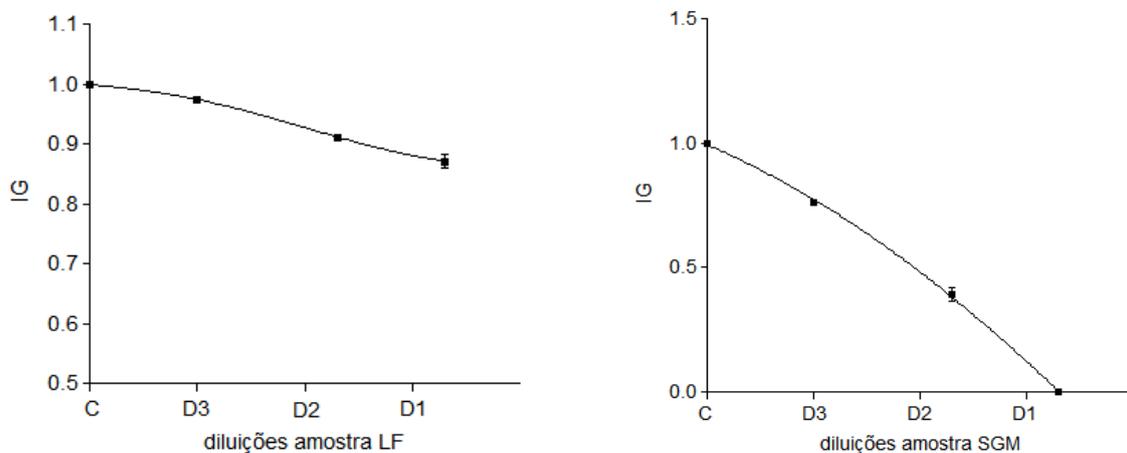
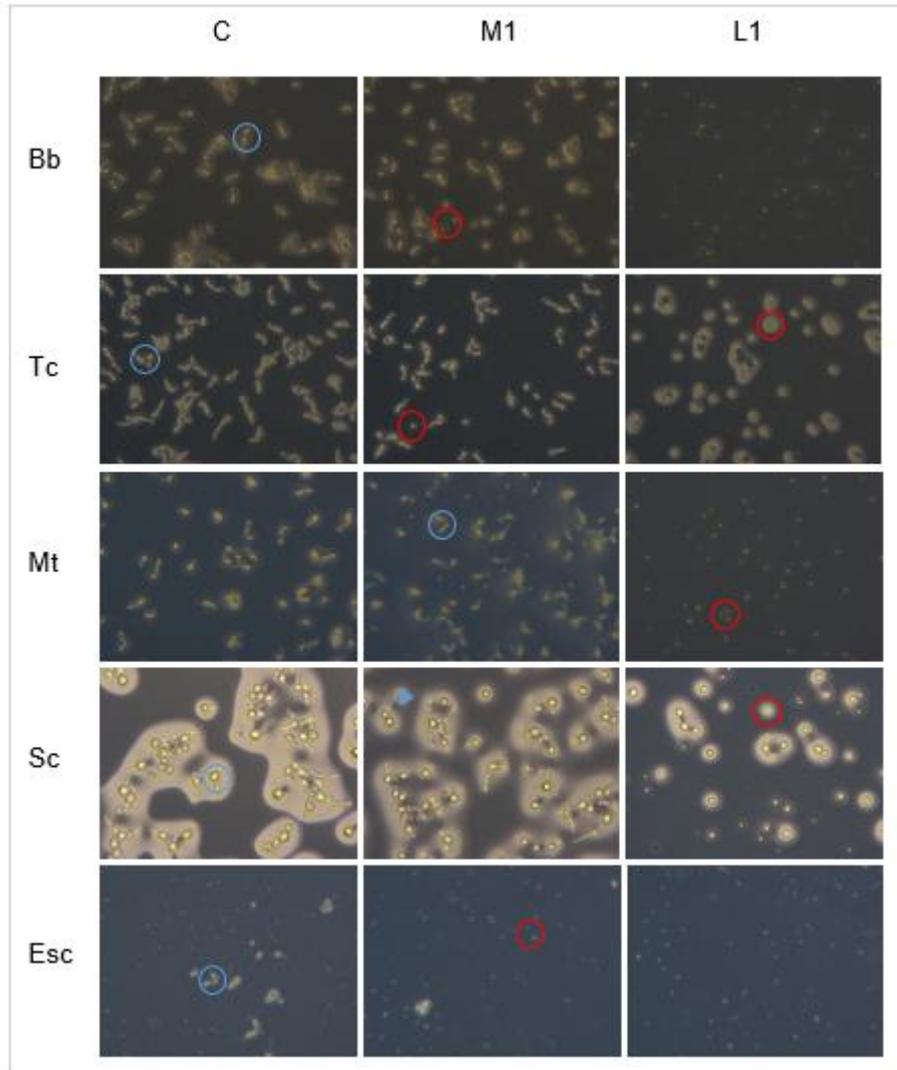


Figura 4 - Imagens das placas de cultivo dos cinco fungos selecionados para tratamento com secreção do líquido fecal (LF, primeira diluição D1) e glândula mandibular (GM, primeira diluição D1) de *Atta sexdens*. Bb: *Beauveria bassiana*; Tc: *Trichoderma harzianum*; Mt: *Metarhizium anisopliae*; Sc: *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.



## 4.2. Análise da presença de peróxido de hidrogênio

### 4.2.1. Teste Colorimétrico

Os dados obtidos no teste colorimétrico estão descritos nas Tabelas 3 e 4. Os valores indicam que a amostra LF é a mais rica em peróxido de hidrogênio e possui caráter ácido, assim como as outras amostras. A concentração de peróxido no FF foi cinco vezes maior comparada a do FP, o que sugere que a participação das formigas no cultivo do fungo *L. gongylophorus* interfere na concentração de peróxido do jardim. Nas amostras FF após contaminação do formigueiro (Tabela 4) notamos um aumento no pH e na quantidade de

peróxido do jardim de fungo contaminado com *Escovopsis* sp, o FF contaminado com isca manteve o pH em 4,5 e apresentou diminuição na quantidade de peróxido no decorrer dos dias de contaminação.

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

Amostra	peróxido (mg/l)	pH
LF	25	5
SGM	5	4,5
FF	10	4,5
FP	2	4,5

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

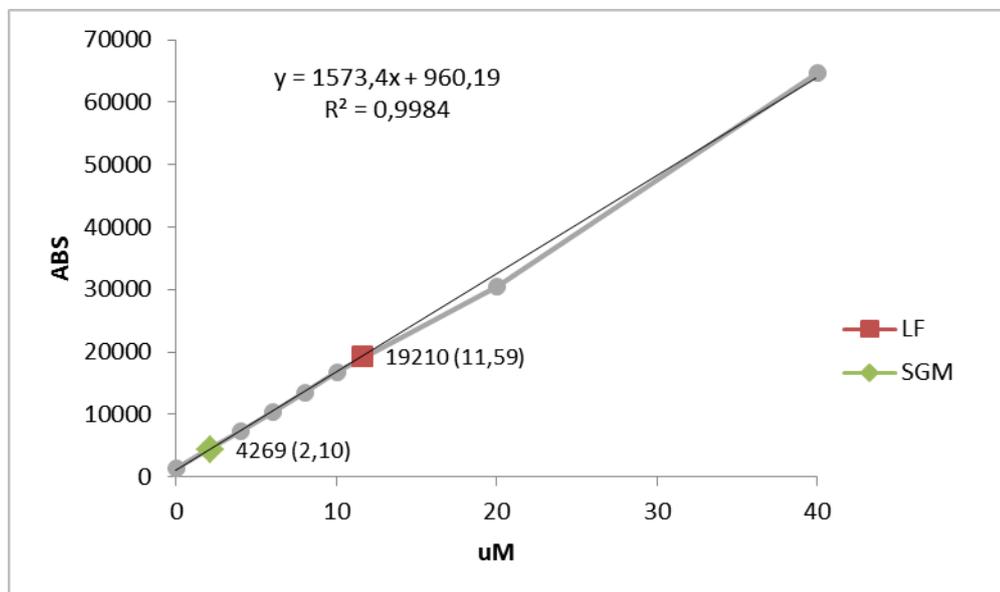
FF	peróxido (mg/l)	pH
<i>Escovopsis</i> sp.	25	5
Isca 24h	10	4,5
Isca 48h	5	4,5
Isca 72h	2	4,5

Por se tratar de uma análise semi-quantitativa baseada em escala colorimétrica, é possível que a cor da amostra interfira na confiabilidade da análise. Notamos isso nos testes realizados com LF, em que a tira de teste apresentou coloração verde após ser mergulhada na amostra, e não azul. O LF possui coloração marrom o que pode ter interferido na tonalidade observada na tira de teste. Sendo assim, consideramos que essa e as outras amostras contêm peróxido de hidrogênio, mas utilizamos outros métodos para quantificá-lo de maneira confiável.

#### 4.2.2. Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit

Os valores de absorbância obtidos durante a análise em espectrofotômetro apontam a presença de peróxido de hidrogênio nas amostras LF e SGM (Figura 5). A curva padrão, que corresponde à relação gráfica entre os valores de absorbância (ABS) e os de concentração, foi construída de acordo com as informações cedidas pelo fabricante do kit de ensaio, no intervalo de 0 a 40  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrogênio. Os dados foram submetidos a uma análise de regressão que gerou uma equação da reta com  $R^2 = 0,998$ .

Figura 5 - Curva padrão de peróxido de hidrogênio (0 a 40  $\mu\text{M}$ ) e dados das amostras de líquido fecal (LF) e secreção da glândula mandibular (SGM) de *Atta sexdens* (Amplex Test).



A equação da reta aplicada aos valores de absorbância das amostras LF e SGM resultou na concentração (mg/l) do composto de interesse presente na amostra (Tabela 5). A amostra LF apresentou concentração média de peróxido de hidrogênio aproximadamente cinco vezes maior que a SGM, a mesma proporção encontrada no teste colorimétrico (Tabela 4) ainda que esse não tenha sido considerado para quantificação das amostras.

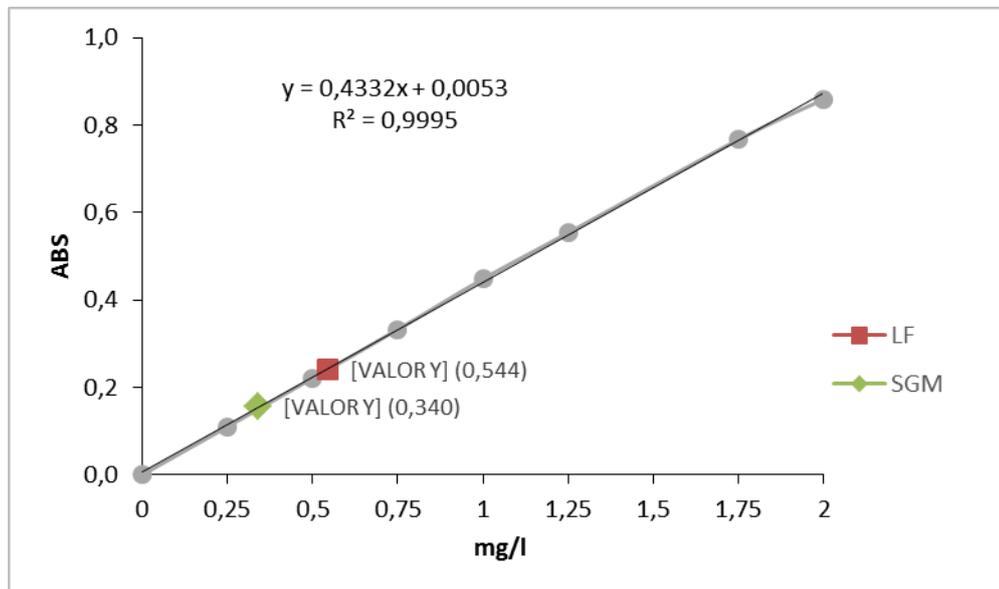
Tabela 5 - Valores de absorvância e concentração média de peróxido de hidrogênio nas amostras de líquido fecal (LF) e secreção da glândula mandibular (SGM) de *Atta sexdens* (Amplex Test).

Amostra	ABS	$\mu\text{M}$	mg/l
LF	19210	11,59	0,39
SGM	4269	2,10	0,07

#### 4.2.3. Spectroquant® Hydrogen Peroxide Test

A análise dos dados obtidos pelo Spectroquant® Hydrogen Peroxide Test foram semelhantes àsquelas conduzidas para o Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit. Porém, a curva padrão utilizada para relacionar graficamente os valores de absorvância (ABS) e os de concentração das amostras foi construída no intervalo de 0 a 2 mg/l de peróxido de hidrogênio, de acordo com a sugestão contida no protocolo do fabricante. A equação da reta, obtida por análise de regressão dos dados, foi aplicada aos valores de absorvância das amostras LF e SGM e indicam a presença de peróxidos nas duas amostras (Figura 6).

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).



A amostra LF apresentou maior concentração de peróxido de hidrogênio do que a amostra SGM. Porém, os valores de concentração (mg/l) das amostras diferiram em proporção quando comparados ao outro teste enzimático (Tabela 5 e 6), sendo que neste teste

a concentração de peróxido de hidrogênio na amostra SGM foi próximo ao valor encontrado para a amostra LF.

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

Amostra	ABS	mg/l
LF	0,241	0,544
SGM	0,155	0,340

### 4.3. Análise da presença de ácido láctico

Os dados da análise indicam a presença de ácido láctico em todas as amostras, com tempo de retenção de 6,6 minutos. Os resultados são apresentados nos cromatogramas a seguir, as setas em vermelho indicam o pico de ácido láctico na amostra:

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

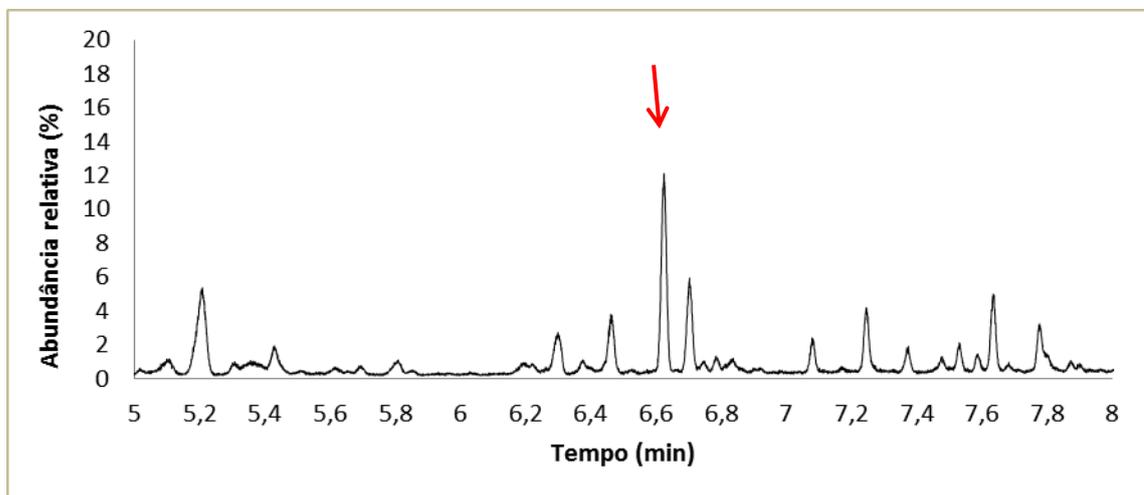


Figura 8 - Cromatograma da amostra do fungo do formigueiro que mostra a abundância relativa do ácido láctico no tempo de retenção 6,6 min (seta).

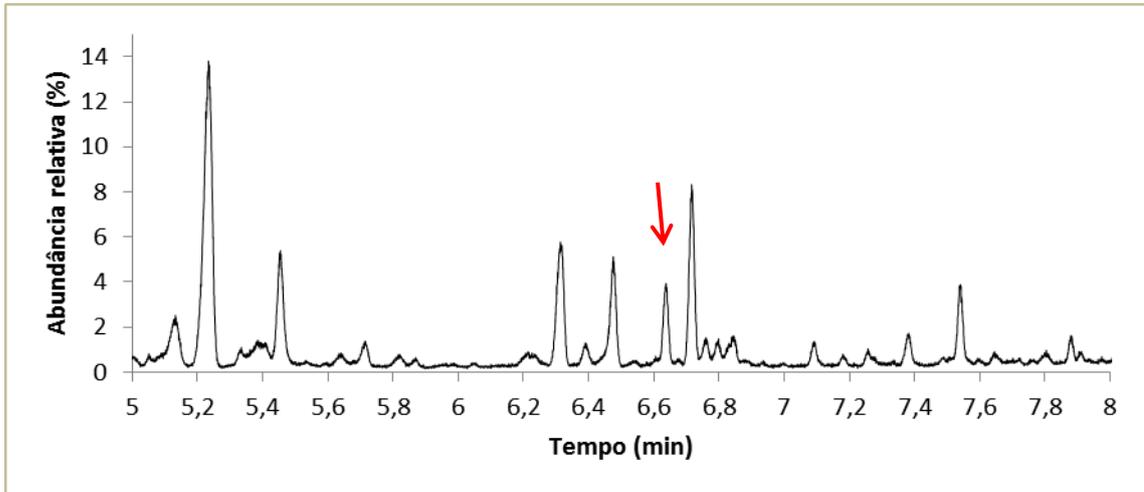
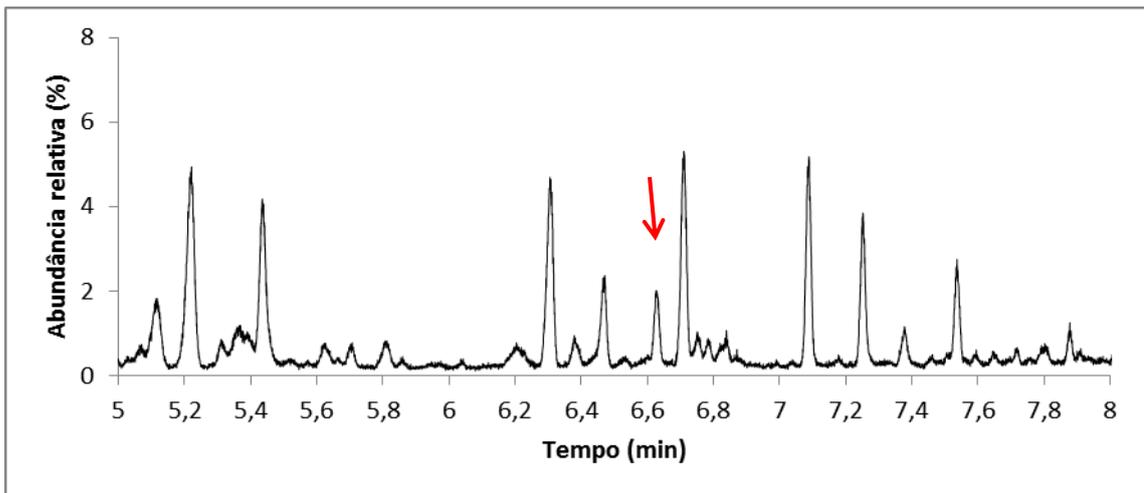


Figura 9 - Cromatograma da amostra do fungo da placa de cultura que mostra a abundância relativa do ácido láctico no tempo de retenção 6,6 min (seta).



O valor de abundância relativa diz respeito ao percentual do composto de interesse em relação ao total de compostos presentes na amostra. A amostra de líquido fecal (12%) apresentou maior abundância relativa de ácido láctico em comparação com as amostras do fungo simbiote, tanto da placa quanto do formigueiro, que apresentaram 4% e 2%, respectivamente. Os valores de “proporção por amostra” obtidos a partir da injeção de um padrão interno foram 0,060 para o LF, 0,035 para o FF e 0,029 para o FP. Esses valores corroboram aos dados de abundância relativa e mostram que o LF é, dentre as três, a amostra que apresentou maior quantidade de ácido láctico.

## 5. Discussão

Os resultados encontrados indicam que as secreções da glândula mandibular e do líquido fecal de *Atta sexdens* têm participação na defesa do indivíduo e da colônia contra fungos patogênicos e antagonistas do fungo mutualista das formigas. Isso porque, a presença das secreções alterou a taxa de germinação de cinco fungos em ensaios com placas de cultivo (Figura 2). A hipótese inicial de que metabólitos naturais contidos nas secreções da formiga-cortadeira são eficazes na inativação de microrganismos foi comprovada, uma vez que há presença do peróxido de hidrogênio, agente oxidante, que em grande quantidade favorece a defesa contra patógenos como sugerido por BOS et al. (2015).

Além disso, o ácido láctico, identificado nas amostras de líquido fecal e do fungo simbiote (Figuras 7 e 8), desempenha importante função contra patógenos, já que modifica o pH dos microrganismos ou pH do meio que rompe sua parede celular (NAIDU et al., 1999; BARBOSA et al., 2011). Esse composto é secretado por bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus*, endossimbiontes de *A. sexdens* (VIEIRA et al., 2017).

Apesar da deposição contínua do ácido láctico no ambiente do ninho, foi verificado que tanto o líquido fecal, quanto o fungo simbiote apresentam pH com baixo grau de acidez em diferentes situações (Tabela 3 e 4). O ninho é, portanto, um ambiente tamponado, ou seja, que não sofre ampla variação do pH. A identificação do composto (AL) nas duas amostras de *L. gonylophorus* sugere que o fungo produz ácido láctico mesmo quando cultivado em placa de cultura, mas que a aplicação do líquido fecal pelas formigas no jardim de fungo deve aumentar a quantidade do ácido no ninho, uma vez que o fungo do jardim apresentou maior abundância relativa (Figuras 8 e 9).

As operárias estão frequentemente depositando as secreções da glândula mandibular e do líquido fecal no ninho, seja durante a atividade de corte, incorporação do material vegetal, cultivo do fungo ou comportamento de limpeza. A presença de agentes antimicrobianos nessas secreções sugere que a sua deposição está participando direta ou indiretamente da estabilidade imunológica e manutenção do pH da colônia e, portanto, pode representar um mecanismo complementar de defesa.

As formigas combinam padrões comportamentais, adaptações fisiológicas e químicas para eliminação de microrganismos com potencial para prejudicar a colônia. Discute-se que os mecanismos comuns e complementares ajudam a manter a estabilidade da colônia por longo período de tempo e criam um microambiente peculiar no ninho com ótimas condições para a vida em sociedade, excluindo a presença de patógenos e antagonistas (SCHULTZ,

1999; MUELLER et al., 2001; TRAGUST et al., 2013; OTTI et al., 2014). Esses mecanismos podem ser divididos em defesa interna (inata e adquirida) e defesa externa (física e química) e estão amplamente relacionados.

São consideradas do sistema imune inato as células de defesa (hemócitos), enzimas e padrões fisiológicos que evoluíram com a pressão do ambiente. (FELDHAAR; GROSS, 2008). Já a defesa imune externa está relacionada às atividades dos indivíduos no ambiente do ninho que promovem a proteção da colônia contra doenças. A remoção física de patógenos é realizada com uso da mandíbula e glossa durante o comportamento de limpeza e também nas atividades de cultivo do fungo simbiote. O contato físico está associado à aplicação das secreções das glândulas exócrinas sobre os indivíduos e o jardim de fungo, algumas com propriedades antimicrobianas que são utilizados na defesa da colônia (MARSARO et al., 2001; CREMER et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008; OTTI et al., 2014).

Dentre as glândulas exócrinas estão: a glândula mandibular, de veneno, de Dufour e a metapleurar (VIEIRA et al., 2012; TRANTER et al., 2014; FERNÁNDEZ-MARIN et al., 2015). Outras glândulas exócrinas como a hipofaríngea, pós-faríngea e salivar do tórax ainda não tiveram seus compostos investigados quanto à função defensiva.

Os simbioses bacterianos também representam um mecanismo defensivo das formigas e, apesar de não ter seus modos de ação bem esclarecidos sabe-se que sua colonização aumenta a capacidade defensiva do hospedeiro e a resistência contra doenças. Na maioria dos casos, a proteção resulta da produção de toxinas e antibióticos que reduzem os efeitos dos patógenos e buscam eliminá-los (DEGNAN; MORAN, 2008).

Os comportamentos de limpeza entre os indivíduos e de assepsia do ninho são comuns ao cotidiano das formigas, mas podem se tornar mais frequentes quando a colônia se encontra ameaçada pela presença de contaminantes. Porém, os cuidados mútuos dentro da colônia durante a imunização social não eliminam a necessidade de respostas imunológica a nível individual. (ARMITAGE; BOOMSMA, 2010; RIBEIRO et al., 2011; ROSENGAUS et al., 2013; LACERDA et al., 2014).

As respostas comportamentais adaptadas nas formigas também dizem respeito a escolha de locais adequados para alocação de seus ninhos. Os ninhos de *Atta* estão sempre localizados em ambiente subterrâneo que, além de proteger o fungo simbiote de estresse térmico e dessecativo, apresenta condições hipóxicas (baixa concentração de oxigênio) e hipercápnicas (alta concentração de dióxido de carbono) (RÖMER et al., 2017). Essas características do microambiente do ninho também são estratégias de defesa dessas formigas e a união de outros fatores, como o controle do pH e assepsia do ninho com uso de secreções

antimicrobiana, torna o ninho um ambiente desfavorável para proliferação de microrganismos contaminantes.

A automedicação da espécie *Formica fusca* com uso de espécies reativas de oxigênio (ROS) também desperta curiosidade. As operárias alteram suas preferências de forrageamento para incluir a ingestão de substâncias que melhoram a sobrevivência dos indivíduos, aumentando o uso de ROS em sua dieta antes (medicação profilática) e após (medicação terapêutica) a infecção real por patógeno. As principais espécies reativas de oxigênio são o ânion radical superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e são produzidas nas reações de redução do metabolismo de plantas e animais. Por serem agentes oxidantes, danificam estruturas celulares e por isso são eficazes na ativação de microrganismos (BOS et al., 2015).

O presente trabalho evidenciou que secreções de *A. sexdens*, depositadas no ambiente do ninho e eficazes na inibição de microrganismos invasores, apresentam o peróxido de hidrogênio em sua composição. É possível que essas formigas utilizem o composto oxidante ( $H_2O_2$ ) produzido em seu metabolismo anaeróbico para melhorar sua resistência a doenças. Aumentar a resistência da colônia pode incluir: fazer a assepsia do ninho, ou seja, tomar medidas profiláticas para evitar a chegada de contaminantes; ou aplicar composto antisséptico sobre a contaminação, procurando minimizá-la. O hábito alimentar dessa espécie voltado para coleta de materiais vegetais pode ser explorado já que, apesar de generalistas, essas formigas apresentam preferência por algumas espécies vegetais. A composição do material vegetal carregado pela operária pode interferir na produção de compostos secundários antimicrobianos dentro do ninho e a ingestão de seiva pela operária também deve ser considerada.

Pressupõe-se que a deposição contínua do líquido fecal sobre o jardim de fungo e ambientes do ninho como atividade de assepsia realizada pelas formigas para manutenção de um ambiente livre de patógenos (asséptico). Por outro lado, em casos de contaminação do jardim de fungo ou a presença de patógenos no material vegetal, por exemplo, sugere-se que as formigas utilizam um composto antisséptico, ou seja, desinfetante que impede a proliferação do microrganismo e reduz a contaminação. À essa função associamos a secreção da glândula mandibular.

As análises de quantificação do líquido fecal apresentaram maior concentração de peróxido de hidrogênio do que a encontrada na secreção da glândula mandibular (Figura 5 e 6), mas não foi eficiente na inibição dos esporos fúngicos. Outros compostos da secreção da glândula mandibular, como o citral, também exerce importante papel na inibição dos esporos,

já que, apesar de apresentar menor concentração de peróxido, ela inibiu totalmente a germinação de quatro dos cinco fungos analisados (Figura 2) (BROUGH, 1983). Deve ser salientado que amostras do jardim de fungo de ninhos contaminados com *Escovopsis* sp. e com iscas tóxicas apresentaram maior concentração de peróxido de hidrogênio no teste colorimétrico nas primeiras 24h (Tabela 4). Portanto, é possível que as operárias tenham aumentado a deposição da secreção da glândula mandibular nas primeiras horas de contaminação.

Diante do exposto, é possível concluir que a defesa das formigas-cortadeiras contra patógenos e antagonistas ao fungo mutualista é multifatorial e nem todos os fatores são ainda conhecidos. Sua capacidade defensiva combina padrões comportamentais, evolutivos e fisiológicos e inclui a defesa interna e externa (física e química). A defesa externa química pode desempenhar papel profilático, ou seja, que evita a chegada de contaminantes ou terapêutico que busca eliminar um patógeno já estabelecido no ambiente. Os cuidados com o jardim de fungo e entre os indivíduos buscam sempre a manutenção de um ambiente asséptico e livre dos riscos de contaminação.

A continuidade de investigação nessa linha de pesquisa se faz necessária para o esclarecimento de outros fatores envolvidos na defesa imune das formigas-cortadeiras. A exploração do papel de outras glândulas exócrinas pouco estudadas como a glândula hipofaríngea, pós-faríngea e salivar do tórax poderia evidenciar a participação de secreções antimicrobiana dessas glândulas durante a lambadura e incorporação do material vegetal. Além disso, a identificação dos peptídeos antimicrobianos presentes nas secreções das glândulas exócrinas e do líquido fecal fortaleceria a hipótese de que essas secreções estão envolvidas mais intensamente com a defesa química das formigas.

## **6. Conclusão**

A presente pesquisa investigou a defesa externa química de *Atta sexdens*, uma estratégia fisiológica dessa espécie para manter asséptico o ambiente do ninho. Os resultados encontrados sugerem que as secreções da glândula mandibular e do líquido fecal, depositadas sobre o jardim de fungo, têm participação na assepsia do ninho e na inibição de patógenos. A secreção da glândula mandibular se mostrou mais eficiente na inibição de esporos fúngicos do que o líquido fecal nos ensaios microbiológicos, inibindo totalmente a germinação de quatro dos cinco fungos testados.

No presente trabalho foi verificada a presença de peróxido de hidrogênio nas secreções da glândula mandibular e do líquido fecal. Esse composto oxidante é produto do metabolismo

anaeróbico das formigas e é utilizado tanto na assepsia quanto na profilaxia da colônia. Além disso, o ácido láctico, também é produzido pelas formigas e atua tornando o ambiente do ninho tamponado. Assim como outros fatores, esses estão envolvidos no estabelecimento de um microambiente asséptico no ninho, mantido no solo sob condições físicas controladas como temperatura, concentração de gases (hipóxia) e manutenção do pH ácido em ambiente tamponado.

O processo de defesa dos ninhos de formigas-cortadeiras é multifatorial e combinam fatores físico-químicos, comportamentais e adaptativos. Estudos complementares acerca dos peptídeos antimicrobianos contidos nas secreções das formigas e a investigação de outras glândulas exócrinas como a hipofaríngea, pós-faríngea e salivar de tórax podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de defesa das formigas-cortadeiras contra patógenos e antagonistas de seu simbionte.

## Referências

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1054p.
- ALMEIDA, R.N.A.; PENÑFLOR, 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>.
- ARMITAGE, S. A. O.; BOOMSMA, J. J. The effects of age and social interactions on innate immunity in a leaf-cutting ant. *J. of Insect Physiol.*, v. 56, n. 7, p. 780-787, 2010.
- 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. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 11, n. 1, 2011.
- 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.
- BOS, N.; SUNDSTRÖM, L.; FUCHS, S.; FREITAK, D. Ants medicate to fight disease. *Evolution*, v. 69, n. 11, p. 2979-2984, 2015.
- CAMPOS, R. C.; GRINBERG, P. Acoplamento Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Absorção Atômica em estudos de especiação: uma revisão. *Quim. Nova*, v. 24, n. 2, p. 220-227, 2001.
- 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.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 96, n. 14, p. 7998-8002, 1999a.
- DEGNAN, P. H.; MORAN, N. A. Diverse phage-encoded toxins in a protective insect endosymbiont. *Applied and Environ. Microbiol.*, v. 74, n. 21, p. 6782-6791, 2008.
- 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>.
- ERTHAL, M.; SILVA, C. P.; SAMUELS, R. I. Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. *Journal of insect physiology*, v. 50, n. 10, p. 881-891, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.06.009>.
- FELDHAAR, H; GROSS, R. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes and Infection*, v. 10, n. 9, p. 1082-1088, 2008.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; NASH, D. R.; HIGGINBOTHAM, S.; ESTRADA, C.; VAN ZWEDEN, J. S.; D'ETTORRE, P.; WCISLO, W.T.; BOOMSMA, J. J. Functional role of phenylacetic acid from metapleural gland secretions in controlling fungal pathogens in evolutionarily derived leaf-cutting ants. *The Royal Society*, v. 282, n. 1807, p. 20150212, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.0212>.

GIRALDO-ECHEVERRI, C. *Microbiota asociada a la casta obrera de la hormiga arriera Atta cephalotes (Hymenoptera: Myrmicinae)*. 2009. 86 p. MSc Thesis. Universidad de Antioquia, Instituto de Biología, Medellín, Colombia, 2009.

HERNÁNDEZ, J.V.; LÓPEZ, H.; JAFFE, K. Nestmate recognition signals of the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *J. of Insect Physiol.*, v. 48, n. 3, p. 287-295, 2002. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00173-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00173-1).

LACERDA, F. G.; DELLA LUCIA, T. M. C.; DE SOUZA, O.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; DE SOUZA, L. M.; COUCEIRO, J. C.; DE SOUZA, D. J. Social interactions between fungus garden and external workers of *Atta sexdens* (Linnaeus) (Hymenoptera: Formicidae). *Italian Journal of Zoology*, v. 81, n. 2, p. 298-303, 2014.

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.

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 Entomology.*, v. 30, n. 3, p. 403-406, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2001000300010>.

MARTIN, M. M. The Biochemical Basis of the Fungus-Attine Ant Symbiosis: A complex symbiosis is based upon integration of the carbon and nitrogen metabolisms of the two organisms. *Science*, v. 169, n. 3940, p. 16-20, 1970.

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>.

MUELLER, U.G.; SCHULTZ, T.R.; CURRIE, C.R.; ADAMS, R. M.; MALLOCH, D. The origin of the attini ant-fungus mutualism. *The Quarterly Review of Biology*, v. 76, n. 2, p. 169–197, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1086/393867>.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Sci. and Nutri.*, v. 39, n. 1, p. 13-126, 1999.

OTTI, O.; TRAGUST, S.; FELDHAAR, H. Unifying external and internal immune defences. *Trends in Ecology & Evolution* v. 29, n. 11, p.625-634, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.09.002>.

REYNOLDS, T. H.; CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia*, v. 96, n. 5, p. 955-959, 2004.

RIBEIRO, M. M. R.; DE SOUZA, D. J.; GANDRA, L. C.; DELLA LUCIA, T. M. C. Immunocompetence and energetic metabolism in different groups of workers of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 58, n. 2, 2011.

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. *Brazil. J. of Microbiol.*, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000100016>.

RÖMER, D.; BOLLAZZI, M.; ROCES, F. Carbon dioxide sensing in an obligate insect-fungus symbiosis: CO<sub>2</sub> preferences of leaf-cutting ants to rear their mutualistic fungus. *PloS one*, v. 12, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174597>.

ROSENGAUS, R. B.; MALAK, T., MACKINTOSH, C. Immune-priming in ant larvae: social immunity does not undermine individual immunity. *Biol Lett*, v. 9, n. 6, p. 20130563, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2013.0563>.

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

SCHUMMER, C.; DELHOMME, O.; APPENZELLER, B. M.; WENNIG, R.; MILLET, M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta*, v. 77, n. 4, p. 1473-1482, 2009.

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. *Current Biology*, v. 23, n. 1, p. 76-82, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.034>.

TRANter, C.; GRAYSTOCK, P.; SHAW, C.; LOPES, J. F. S.; HUGHES, W. O. H. Sanitizing the fortress: protection of ant brood and nest material by worker antibiotics. *Behav. Ecology and Sociobiol.*, v. 68, n. 3, p. 499-507, 2014.

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. *Curr. Microbiol.*, v. 74, n. 10, p. 1216-1225, 2017.

ZAMUNÉR, C. F. C. (2015). Biocontrole de formigas-cortadeiras utilizando o fungo *Escovopsis*. 38f. Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2015.

### *Capítulo 3*

*Inibição de esporos fúngicos com uso de compostos presentes nas  
secreções das formigas-cortadeiras*

## RESUMO

As formigas-cortadeiras do gênero *Atta* desempenham intensa atividade de corte de materiais vegetais para o cultivo de seu fungo mutualista e isso as caracterizam como pragas agrícolas. O controle biológico, apesar de promissor, ainda não é eficiente no controle dessas formigas, uma vez que elas apresentam grande capacidade de reconhecer e eliminar patógenos potenciais. Os mecanismos de defesa contra patógenos envolvem comportamentos de limpeza, secreções antimicrobianas e células da defesa imune interna. Outras secreções frequentemente depositadas no ninho pelas operárias, como o líquido fecal e da glândula mandibular, podem representar um mecanismo complementar de defesa, já que são capazes de inibir a germinação de fungos entomopatogênicos e antagonistas do fungo mutualista. No presente estudo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ácido láctico (AL), identificados previamente nessas secreções, tiveram seu potencial antimicrobiano avaliado, a partir de testes de inibição de fungos. Para isso, foram utilizadas suspensões de esporos de cinco espécies fúngicas, frequentemente encontradas em ninhos de *Atta sexdens*, em diferentes concentrações de  $H_2O_2$  de 0 a 50mM. Outros ensaios foram conduzidos utilizando uma suspensão de esporos de *Beauveria bassiana* preparada com diferentes concentrações de AL, tampão lactato e a solução de  $H_2O_2$  e tampão lactato. Os resultados indicam que o  $H_2O_2$  apresenta alto potencial antimicrobiano, uma vez que inibiu totalmente a germinação dos cinco fungos avaliados. *Trichoderma harzianum* se mostrou mais suscetível a ação do composto e teve 50% dos esporos inibidos mesmo nas menores concentrações de  $H_2O_2$  (0,5 e 1mM). O AL também alterou a taxa de germinação dos esporos, mas os melhores resultados de inibição ocorreram nas maiores concentrações (20 e 50 mM). Por outro lado, o tampão lactato alterou muito pouco a taxa de germinação de esporos, mas quando em solução com o  $H_2O_2$  inibiu totalmente a germinação a partir da concentração 5mM. O efeito sinérgico desses dois componentes simula a composição do líquido fecal da formiga e, portanto, corrobora o potencial antimicrobiano dessa secreção. Os resultados das avaliações das secreções das formigas revelam os efeitos inibitórios de seus compostos sobre os fungos entomopatogênicos e antagonistas do mutualista, e desta forma devem ser incluídos no rol de atividades que compreende a defesa imune externa da formiga-cortadeira *Atta sexdens*.

Palavras-chave: peróxido de hidrogênio, ácido láctico, defesa química, líquido fecal, secreção da glândula mandibular, agentes antimicrobianos.

## 1. Introdução

A Tribo Attini compreende 45 gêneros, dentre eles estão 17 gêneros (Subtribo Attina) de formigas cultivadoras de fungo (WARD et al., 2014; WARD AntWeb, 2018). Essas formigas cultivam em seus ninhos o fungo mutualista que é base alimentar das colônias e, para isso, coletam diversos materiais vegetais que servem com o substrato para o crescimento do fungo. O gênero *Atta* compreende espécies de formigas-cortadeiras que cultivam em seu jardim o fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* e são consideradas pragas agrícolas, pois realizam intensa atividade de corte de material vegetal fresco (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; MUELLER et al., 2001).

Diversos estudos investigam métodos de controle capazes de minimizar os prejuízos causados pelas formigas-cortadeiras, dentre eles estão o controle químico, controle mecânico e o controle biológico, esse último utiliza fungos entomopatógenos e antagonistas do fungo mutualista da formiga. Apesar de ter se mostrado promissor, o controle biológico apresenta limitações no controle de formigas-cortadeiras. A principal delas é a capacidade dessas formigas de detectar e se recuperar ações de agentes patogênicos em condições naturais (MONTROYA-LERMA et al., 2012; DELLA-LUCIA, 2014; BRITTO et al., 2016).

Os mecanismos de defesa das formigas envolvem padrões comportamentais de limpeza, concomitante à secreção de compostos antimicrobianos pelas glândulas exócrinas e simbiontes bacterianos e as células da defesa imune interna. A combinação multifatorial desses mecanismos proporciona o estabelecimento de um microambiente asséptico no ninho e gera uma profilaxia social entre os indivíduos da colônia (MARSARO et al., 2001; RODRIGUES et al., 2008; CREMER et al., 2007, KONRAD et al., 2012, TRAGUST et al., 2013, OTTI et al., 2014). Mecanismos complementares de defesa relacionados às secreções glandulares e não glandulares produzidas pelas formigas-cortadeiras, ainda são pouco investigados.

TRAGUST (2016) realizou análises sobre a evolução da defesa imune externa das formigas e se ela favoreceu os insetos sociais devido ao seu estilo de vida (eusociais). Especificamente explorou os compostos presentes nas glândulas metapleurais e glândula de veneno com potencial de agir na defesa imune externa.

Também é passível de discussão se outras secreções que entram em contato direto com o jardim de fungo, como o líquido fecal e a secreção da glândula mandibular, fazem parte da defesa imune externa das formigas, participando direta ou indiretamente do estabelecimento de um ambiente livre de patógenos no ninho. Avaliar como compostos presentes nessas

secreções interferem na contaminação por fungos entomopatogênicos e antagonistas pode colaborar para compreensão dos mecanismos de defesa imune externa das formigas-cortadeiras e corroborar seu potencial antimicrobiano.

Na presente pesquisa, o potencial defensivo de dois compostos, tanto peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) quanto o ácido láctico (AL) foi avaliado, presentes nas secreções das formigas (Ver capítulo 2).

O  $H_2O_2$  é uma espécie reativa intermediária do oxigênio (ROS), assim como o radical superóxido e os radicais hidroxila. Essas espécies de oxigênio não completamente reduzidas são conhecidas como tóxicas, devido a produtos de vários processos redox celulares consumidores de  $O_2$  responsáveis por causar sintomas de dano oxidativo, caso a produção de ROS exceda a capacidade de reações (GUTTERIDGE; HALLIWEL, 1989; CHEN; SCHOPFER, 1999). Os danos oxidativos causados por moléculas como o  $H_2O_2$  o torna eficaz na inativação de microrganismos.

Ácidos orgânicos de cadeia carbônica curta, como o ácido láctico, também apresentam caráter antimicrobiano, uma vez que podem desencadear tanto efeitos fungistático como fungicida. Os compostos produzidos pelas bactérias lácticas, como o ácido láctico, causam alterações de pH que influenciam no crescimento de microrganismos, podendo ser suficientes para provocar a total inibição de leveduras ou outras bactérias (NEAL et al., 1965; PIARD et al., 1991). Concentrações crescentes de ácido láctico reduzem exponencialmente a taxa de crescimento do *Saccharomyces cerevisiae* (NARENDRANATH et al., 2001).

## 2. Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano de dois compostos encontrados nas secreções da formiga-cortadeira *Atta sexdens*, o peróxido de hidrogênio e o ácido láctico, a fim de verificar suas participações na defesa imune externa da formiga. Para tal, foram utilizados os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e os fungos antagonistas do mutualista das formigas *Trichoderma harzianum*, *Syncephalastrum* sp. e *Escovopsis* sp.

Especificamente, buscou-se:

1- Verificar se o peróxido de hidrogênio e o ácido láctico, em diferentes concentrações, são capazes de inibir a germinação de esporos de fungos patogênicos e antagonistas do mutualista das formigas.

2- Verificar o potencial do ácido láctico e da solução de tampão lactato e peróxido de hidrogênio na inibição da germinação de esporos fúngicos.

3- Avaliar se a presença de um agente redutor junto ao peróxido de hidrogênio altera o índice de germinação dos esporos fúngicos, a fim de comprovar seu potencial antimicrobiano.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Germinação dos esporos fúngicos

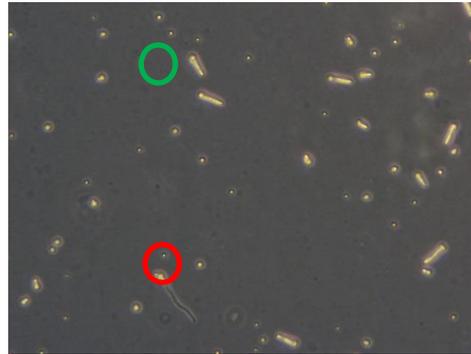
Cinco fungos entomopatogênicos ou antagonistas do fungo mutualista das formigas-cortadeiras foram utilizados na presente análise: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma harzianum*, *Syncephalastrum* sp. e *Escovopsis* sp. As culturas puras dos fungos foram cedidas por empresas do setor de controle biológico ou fornecidas pelo banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia - Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP), Rio Claro

Um ensaio piloto foi conduzido para determinar o tempo de germinação em meio sólido para todos os fungos utilizados. Para isso, preparou-se uma suspensão de esporos em água destilada com  $6 \times 10^6$  esporos /ml para cada fungo. A padronização da concentração de esporos foi realizada utilizando a câmara de Neubauer. A suspensão de esporos foi homogeneizada em vórtex e filtrada com auxílio de uma pipeta de vidro de 10 ml contendo algodão estéril, a fim de retirar as hifas da solução e manter apenas os esporos fúngicos. Posteriormente, 150  $\mu$ L dessa suspensão foram plaqueados em placas de Petri contendo meio de cultura.

Para quatro dos cinco fungos utilizou-se meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e para o *Escovopsis* sp. optou-se por utilizar o meio ágar malte. Ambos meios de cultura foram preparados conforme as especificações do fabricante e autoclavados à 120°C por 20 minutos. Utilizou-se 3 ml de meio de cultura em cada placa de Petri, nas quais os esporos foram inoculados e, com uma alça de Drigalski, fez-se o espalhamento sobre a superfície do meio de cultura. O ensaio foi realizado em triplicatas, as placas foram incubadas em B.O.D a 25°C e observadas periodicamente em microscópio invertido Primovert Zeiss® até o início da germinação dos esporos.

O início da germinação foi considerado quando pelo menos 10% dos esporos contidos no campo de visão da objetiva de 200x do microscópio apresentavam desenvolvimento de hifas, como ilustrado na Figura 1. O tempo de início da germinação de cada espécie fúngica foi utilizado durante os ensaios de inibição como sendo o tempo inicial de incubação.

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



### 3.2. Inibição da germinação de fungos

O potencial antimicrobiano do peróxido de hidrogênio e do ácido láctico foi avaliado por intermédio de testes *in vitro*, verificando o efeito desses compostos sobre a germinação dos cinco fungos entomopatogênicos ou antagonistas do fungo mutualista das formigas. Variações do teste inicial foram realizadas somente com a *B. bassiana*, utilizando o tampão lactato de sódio pH 4 (TL) e de tiosulfato de sódio (TS).

Inicialmente foi estabelecida uma curva de inibição utilizando compostos comerciais: no caso do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) utilizou-se o Perhydrol 30% EMSURE® (cat. 107209 Merck) nível analítico e o ácido láctico (AL) nível cromatográfico. Ambos permaneceram armazenados em geladeira e protegidos da luz durante a montagem do bioensaio.

Para os testes de inibição, realizados em triplicata, os compostos foram diluídos em água destilada nas concentrações: 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 e 50 mM. O peróxido nessas concentrações foi utilizado em testes de inibição com as cinco espécies de fungos. Já as concentrações de ácido láctico foram utilizadas em teste de inibição apenas para *B. bassiana*. Optou-se pelo uso deste fungo nos testes com ácido láctico e demais compostos por se tratar de um fungo entomopatogênico, amplamente utilizado na agricultura como agente de controle biológico e que, preliminarmente, apresentou bons resultados no cultivo em laboratório e tempo de germinação satisfatório para realização dos ensaios biológicos.

Uma suspensão de esporos com concentração  $6 \times 10^6$  esporos/ml foi preparada utilizando os compostos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e AL) em diferentes concentrações. Para o grupo controle, a suspensão de esporos utilizou apenas água destilada. O método utilizado foi o mesmo descrito para o teste de tempo de início da germinação (Item 3.1.) e, portanto, a suspensão de esporos foi submetida a homogeneização em vórtex, seguido da filtragem utilizando-se de uma pipeta

de vidro de 10 ml e algodão estéril. As amostras contendo os esporos foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente e protegidas da luz e, posteriormente, alíquotas de 150 µl da suspensão de esporos foi semeada em placas contendo meio de cultivo BDA (batata-dextrose-ágar) para todos os fungos, com exceção do *Escovopsis* sp. em que se utilizou o meio de cultivo ágar malte

As amostras foram espalhadas em placas de cultivo com uso da alça de Drigalski em triplicatas. As placas foram mantidas em B.O.D a 25°C pelo período determinado como tempo de início da germinação dos esporos, então, foram fotografadas no microscópio invertido Primovert Zeiss® para contagem dos esporos. Para realizar uma distribuição equitativa das fotos, cada placa foi dividida em seis partes e de cada uma delas foi fotografada em duas regiões, totalizando 12 fotografias por placa.

Para determinar o índice de germinação dos fungos, foram realizadas as contagens dos esporos germinados (EG) e não germinados (EN). Foram considerados germinados os esporos que continham início do crescimento de hifas (Figura 1). Posteriormente, os valores foram acumulados e determinado o índice de germinação (IG) utilizando a seguinte equação:

$$IG = \frac{EG}{EG + EN}$$

Os valores obtidos de índice de germinação foram submetidos a análise de regressão não linear utilizando o “software” Graphpad Prism 7.0.4, obtendo-se assim as curvas de inibição. Para a análise foram utilizados os valores de log das concentrações dos compostos.

As variações do teste de inibição do fungo *B. bassiana* foram realizadas com uso de tampão lactato de sódio pH 4 (TL) e de tiosulfato de sódio (TS). Justifica-se estas análises pelo fato de que a colocação de líquido fecal no interior do ninho é praticamente constante e mesmo assim o pH não é alterado. Isto sugeriu que o interior do ninho poderia estar tamponado com o lactato. Para verificar esta hipótese, testes de inibição foram realizados com o TL e a ele acrescido da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A contraprova do teste foi realizada utilizando o TL, acrescido do TS, composto redutor com potencial de inibir a ação da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Foram realizados testes de inibição da germinação de *B. bassiana* com as seguintes soluções: TL e TL+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 a 50 mM); TS e TS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10, 20 e 50 mM). O método utilizado para realização do teste em placas foi o mesmo descrito anteriormente no item 3.1.

## 4. Resultados

### 4.1. Germinação dos esporos fúngicos

A observação periódica das placas em triplicatas de cada fungo permitiu determinar o tempo de início de germinação (TG) para as várias espécies. Esse dado foi utilizado como tempo de incubação das placas em B.O.D em todos os ensaios microbiológicos realizados.

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

<b>Espécie fúngica</b>	<b>TG</b>
<i>Trichoderma harzianum</i>	8 horas
<i>Metarhizium anisopliae</i>	12 horas
<i>Syncephalastrum</i> sp.	16 horas
<i>Beauveria bassiana</i>	17 horas
<i>Escovopsis</i> sp.	48 horas

#### 4.2. Inibição dos esporos fúngicos com peróxido de hidrogênio

Os resultados obtidos nos testes de inibição sugerem que o peróxido reduz as taxas de germinação dos esporos das cinco espécies de fungos analisadas. Essa redução foi proporcional à concentração do  $H_2O_2$ , de forma que a maior delas (50 mM) inibiu completamente a germinação de todos os fungos. As curvas de inibição construídas utilizando a média dos valores dos esporos germinados em cada concentração mostram como o  $H_2O_2$  altera o índice de germinação dos fungos.

A Tabela 2 apresenta dados da análise de regressão não linear, destacando o logEC50, valor no qual a inibição da germinação de esporos foi de 50%. As figuras de 2 a 6 representam as curvas de inibição provocadas pelos diferentes fungos.

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  $H_2O_2$  correspondente ao log.

<b>Fungo (espécie)</b>	<b>Log EC50</b>	<b>mM aprox.</b>
<i>Beauveria bassiana</i>	- 2,509	5 – 10 mM
<i>Metarhizium anisopliae</i>	- 2,427	5 – 10 mM
<i>Trichoderma harzianum</i>	- 3,523	0,5 – 1 mM
<i>Escovopsis</i> sp.	- 2,628	5 – 10 mM
<i>Syncephalastrum</i> sp.	- 2,078	10 – 20 mM

Figura 2: Curva de inibição da germinação de esporos de *Beauveria bassiana* após tratamento com  $H_2O_2$  em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: valores de concentração (mM).

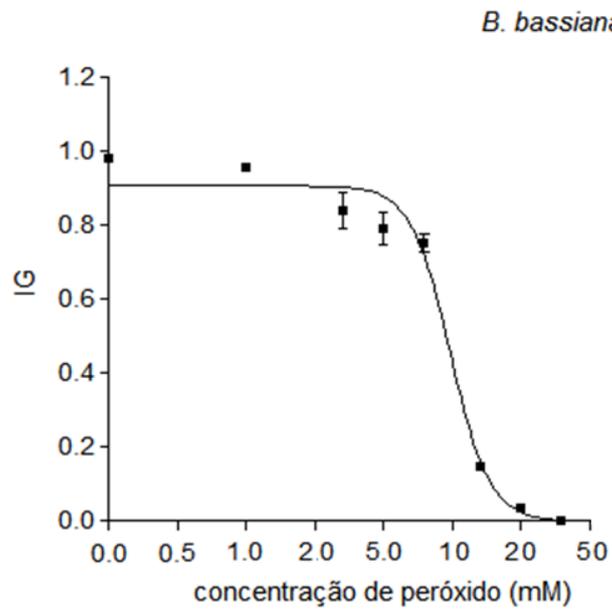


Figura 3: Curva de inibição da germinação de esporos de *Metarhizium anisopliae* após tratamento com  $H_2O_2$  em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: valores de concentração (mM).

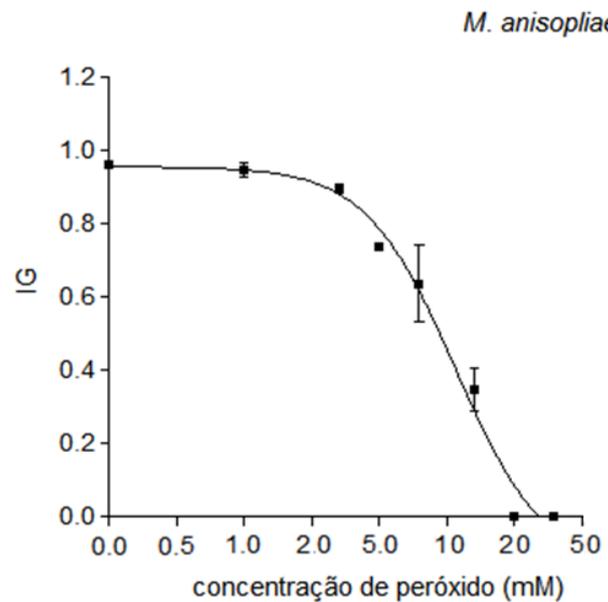


Figura 4: Curva de inibição da germinação de esporos de *Trichoderma harzianum* após tratamento com  $H_2O_2$  em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: valores de concentração (mM).

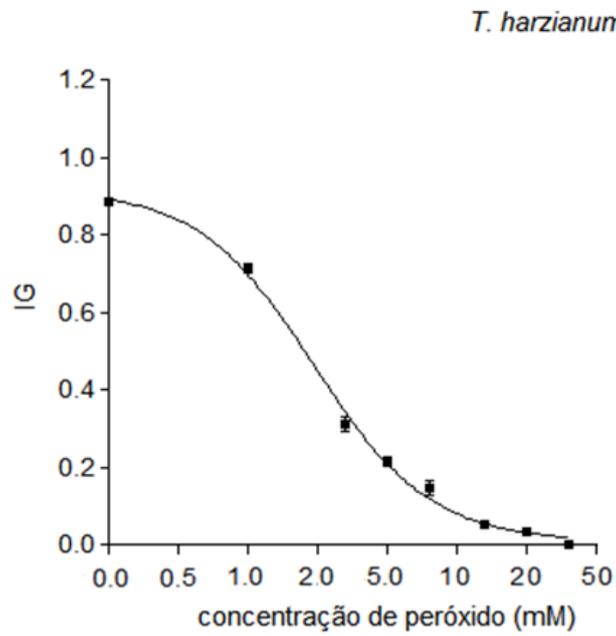


Figura 5: Curva de inibição da germinação de esporos de *Escovopsis* sp. após tratamento com  $H_2O_2$  em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: valores de concentração (mM).

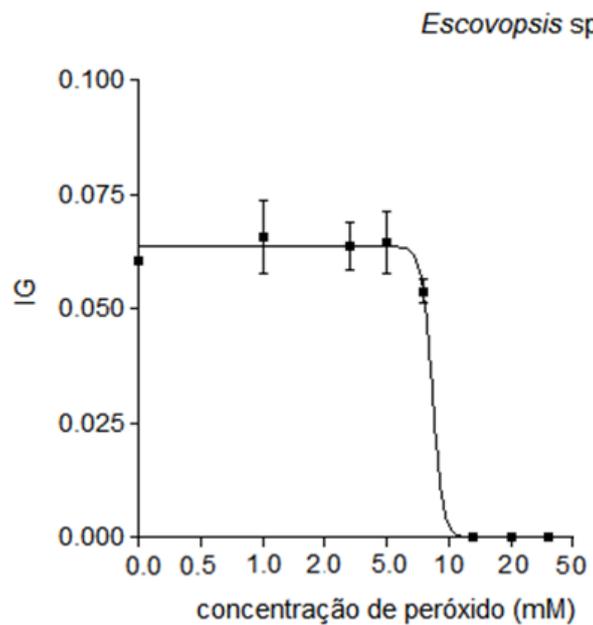
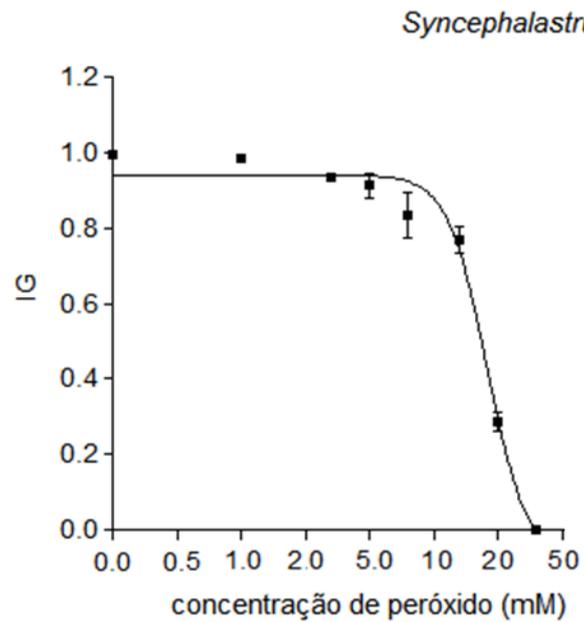
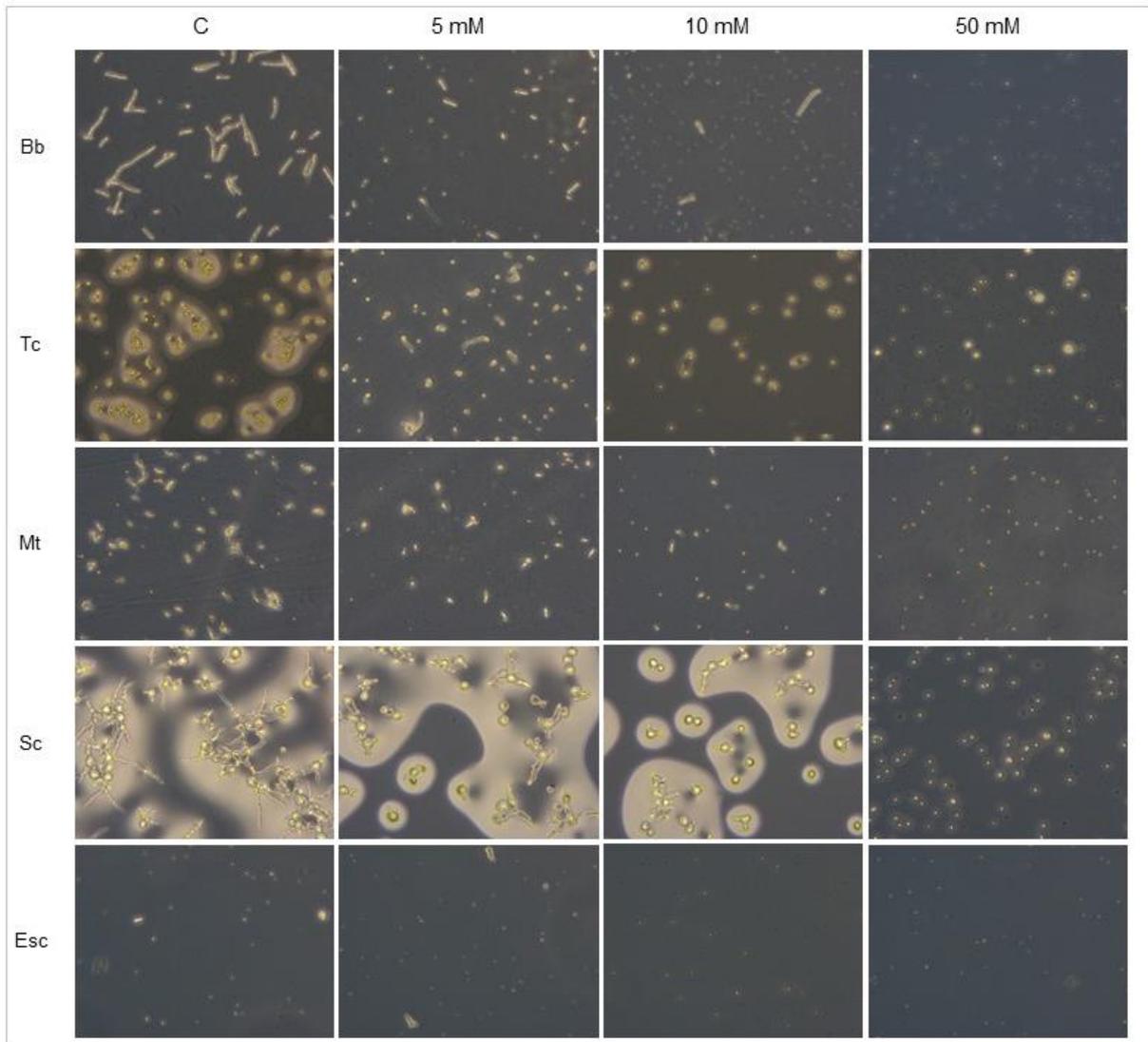


Figura 6: Curva de inibição da germinação de esporos de *Syncephalastrum* sp. após tratamento com  $H_2O_2$  em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: valores de concentração (mM).



A Figura 7 ilustra as alterações ocorridas no padrão de germinação dos esporos fúngicos quando o peróxido foi adicionado ao meio em diferentes concentrações.

Figura 7 Fotografias obtidas das placas de cultivo dos cinco fungos tratados com  $H_2O_2$  em diferentes concentrações. Bb: *Beauveria bassiana*; Tc: *Trichoderma harzianum*; Mt: *Metarhizium anisopliae*; Sc: *Syncephalastrum* sp.; Esc: *Escovopsis* sp. C: controle. A: 200x.



#### 4.3. Inibição dos esporos fúngicos com ácido láctico

Os testes de inibição dos esporos fúngicos de *B. bassiana* na presença do AL em diferentes concentrações indicam que, da mesma forma que o  $H_2O_2$  apresenta atividade antimicrobiana. A Figura 8 contém a curva de inibição e a Figura 9 as fotografias dos esporos nas diferentes concentrações.

Figura 8: Curva de inibição da germinação de esporos de *Beauveria bassiana* após tratamento com ácido láctico (AL) em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: valores de concentração (mM).

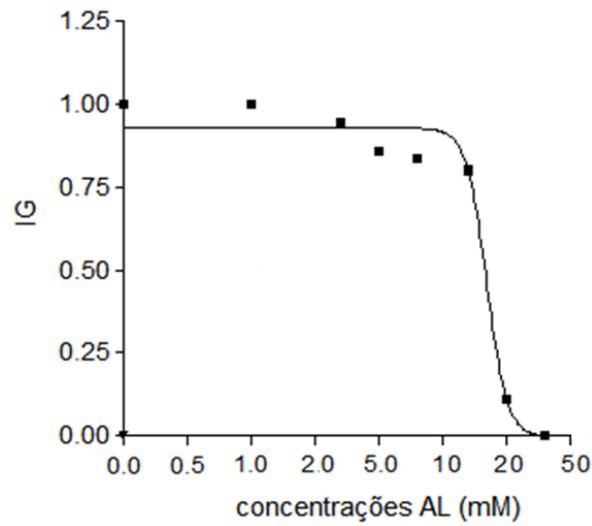
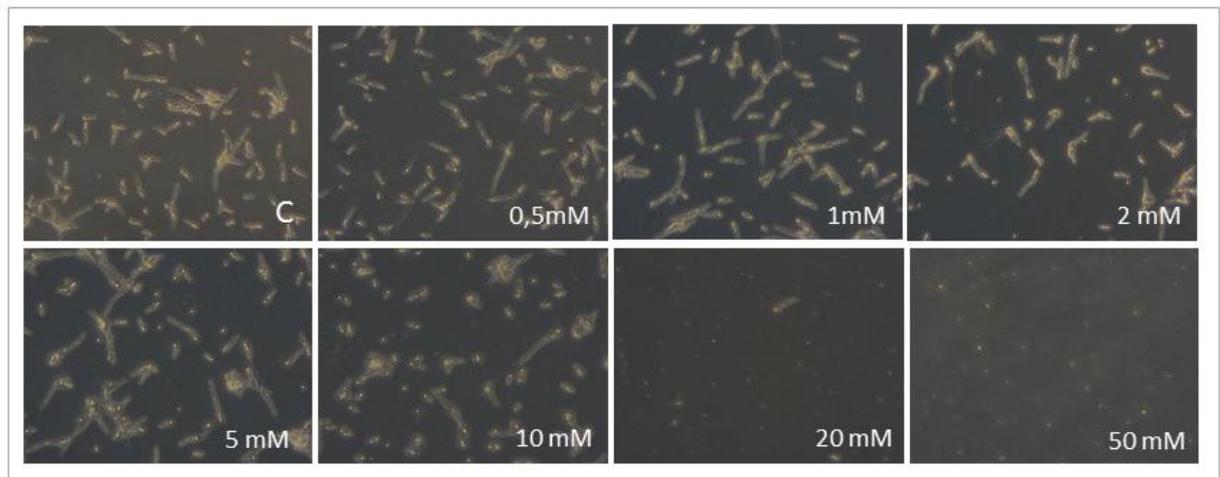


Figura 9: Fotografias dos esporos de *Beauveria bassiana* em placas de cultivo após tratamento com diferentes concentrações de ácido láctico (AL). C: controle. A: 200x.



#### 4.4. Inibição dos esporos fúngicos com outros compostos

##### 4.4.1. Tampão lactato de sódio (TL)

O teste de inibição dos esporos fúngicos realizados com o TL (pH 4) utilizou as mesmas concentrações definidas nos ensaios com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e AL. E foi conduzido de duas maneiras: somente o TL foi utilizado para preparo da suspensão de esporos; TL e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram utilizados durante o preparo da suspensão. Os resultados mostram que o TL não inibiu totalmente a germinação dos esporos de *B. bassiana* em nenhuma concentração (Figura 10), mas alterou o índice de germinação na concentração 50 mM (Figura 11). Além disso, quando utilizamos o TL no cultivo das placas observamos um atraso no tempo de germinação dos esporos de aproximadamente uma hora.

Figura 10: Imagens dos esporos de *Beauveria bassiana* em placas de cultivo após tratamento com diferentes concentrações de tampão lactato de sódio pH 4 (TL). C: controle. A: 200x.

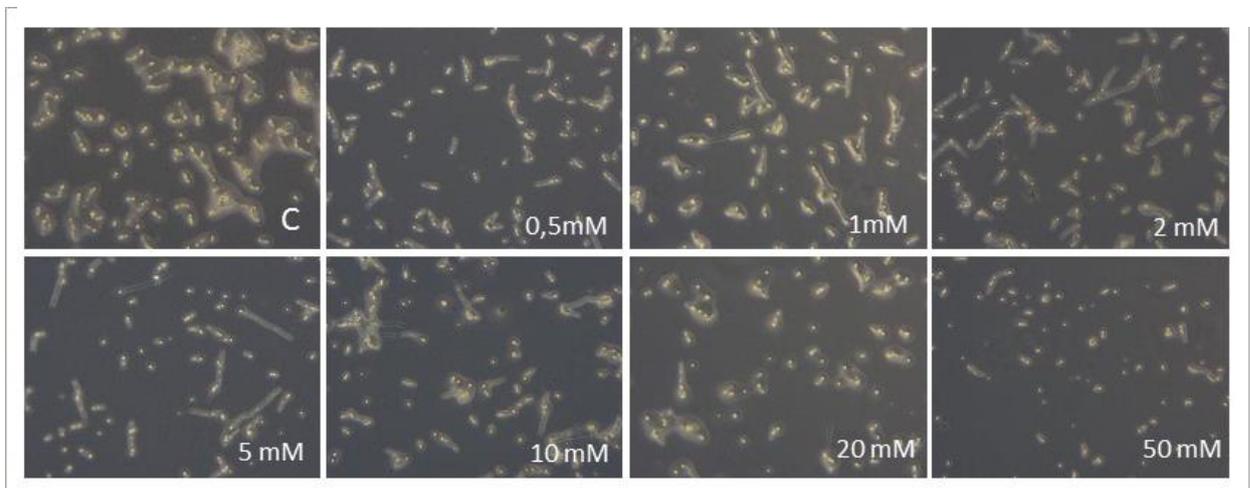
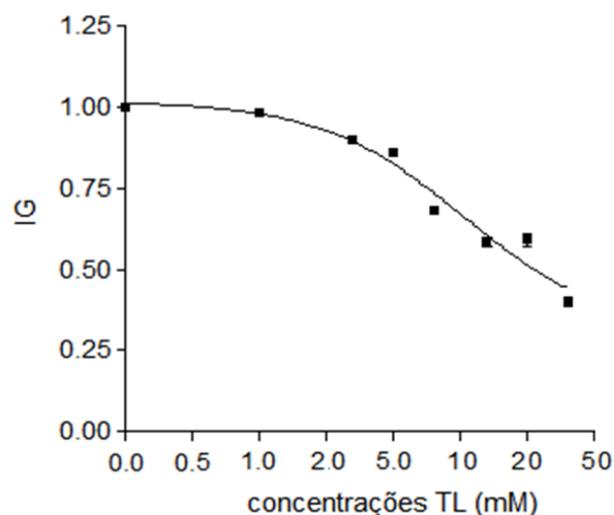


Figura 11: Curva de inibição da germinação de esporos de *Beauveria bassiana* após tratamento com tampão lactato de sódio (TL) pH 4 em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: valores de concentração (mM).



Quando em solução com o  $H_2O_2$ , o TL alterou a germinação dos esporos, inibindo-a totalmente já na concentração 10mM (Figura 12), a ação dos dois compostos foi capaz de reduzir o índice de germinação mesmo nas menores concentrações (Figura 13).

Figura 12. Fotografias dos esporos de *Beauveria bassiana* em placas de cultivo após tratamento com diferentes concentrações de tampão lactato de sódio pH 4 com peróxido de hidrogênio (TL+ $H_2O_2$ ). C: controle. A: 200x.

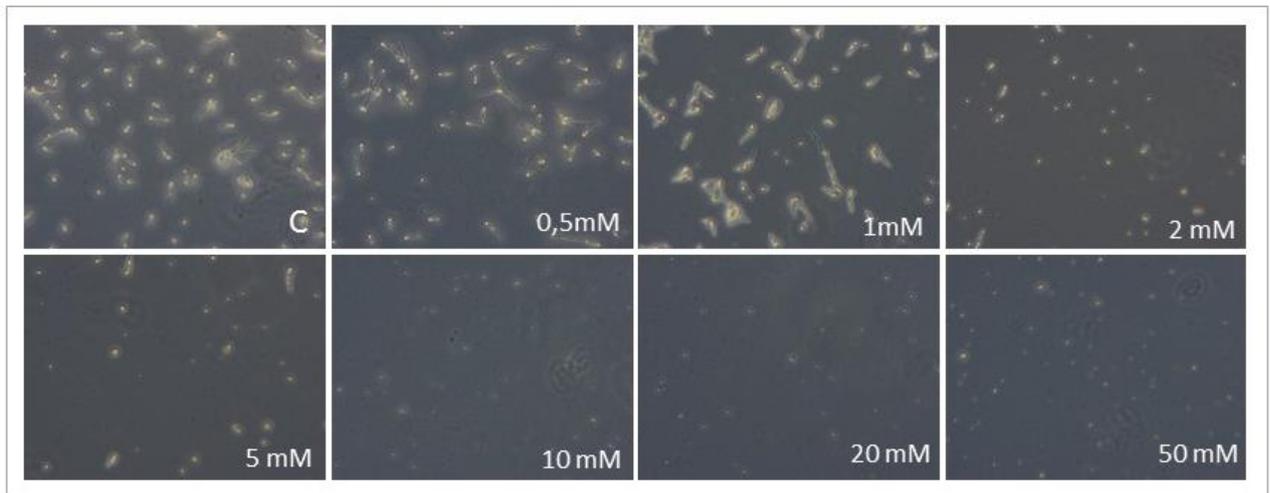
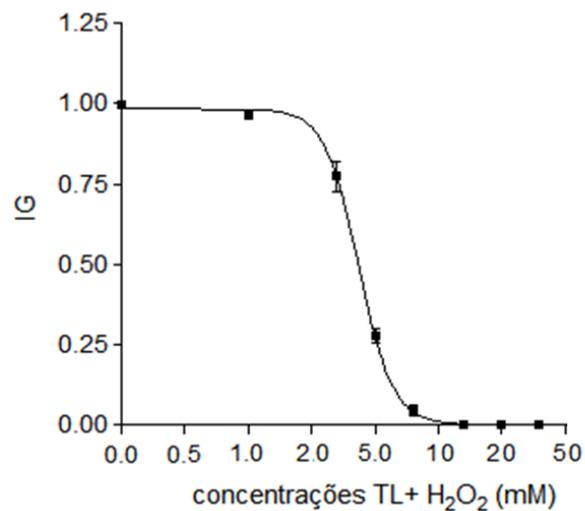


Figura 13: Curva de inibição da germinação de esporos de *Beauveria bassiana* após tratamento com TL+ $H_2O_2$  em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: valores de concentração (mM).

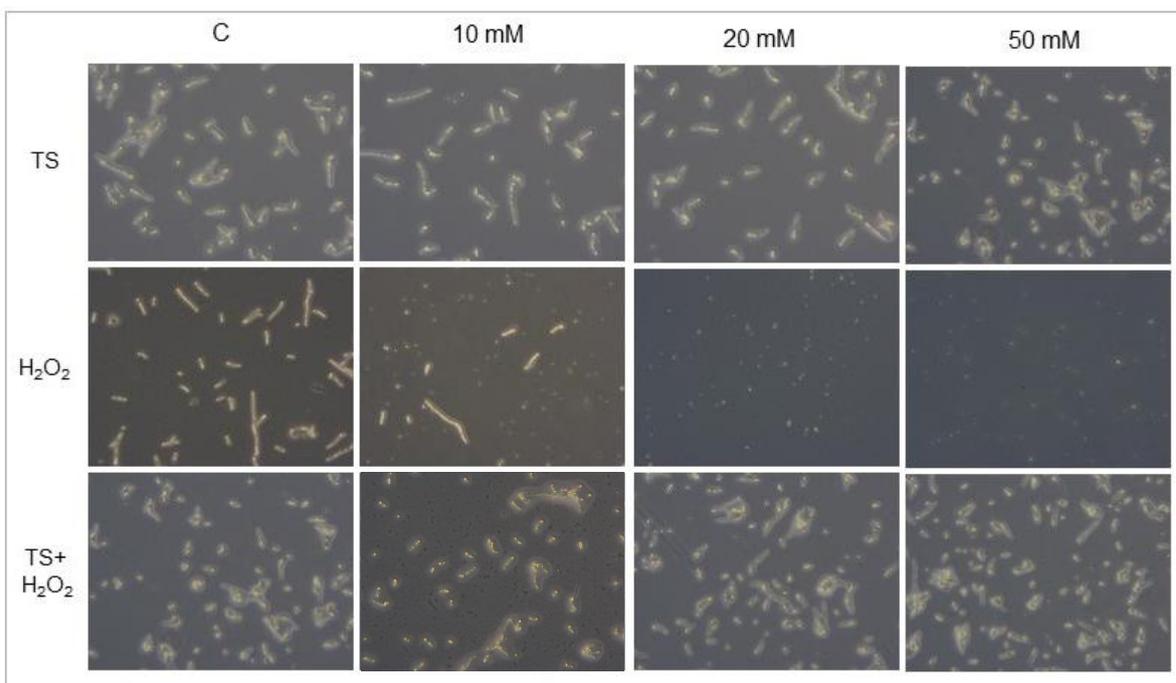


#### 4.4.2. Tiosulfato de sódio (TS)

O ensaio de inibição acrescido de TS foi conduzido em três situações realizadas concomitantemente para facilitar a análise comparativa: somente TS; somente  $H_2O_2$  e TS+ $H_2O_2$ . Esses compostos foram utilizados nas concentrações 10, 20 e 50mM. As imagens

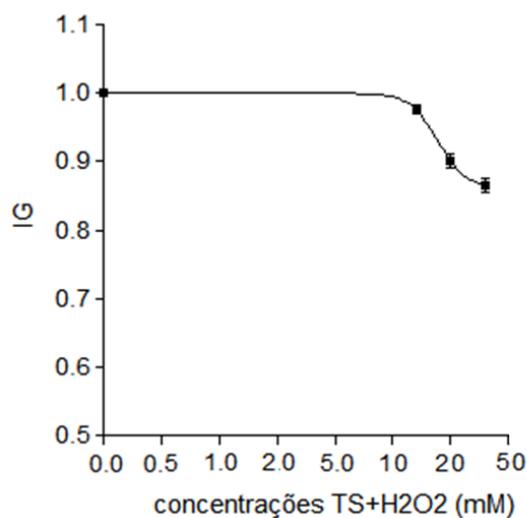
obtidas em microscópio invertido mostram que o TS não revelou atividade antimicrobiana e por isso não inibiu a germinação dos esporos de *B. bassiana* mesmo na maior concentração. O  $H_2O_2$  inibiu da mesma forma que os testes anteriores, mas por se tratar de um agente redutor, mas quando colocado junto com o  $H_2O_2$ , alterou os resultados, neutralizando sua ação antimicrobiana (Figura 14).

Figura 14: Imagens dos esporos de *B. bassiana* em placas de cultivo após tratamento com três concentrações de tiosulfato sódico (TS), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e a misturas dos dois compostos (TS+ $H_2O_2$ ). C: controle. A: 200x.



O índice de germinação pouco sofreu alterações nos tratamentos com TS+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparados ao controle na curva de inibição (Figura 15).

Figura 15: Curva de inibição da germinação de esporos de *Beauveria bassiana* após tratamento com TS+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações. IG: índice de germinação. Eixo x: valores de concentração (mM).



## 5. Discussão

O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o ácido láctico (AL), compostos encontrados nas secreções da glândula mandibular e do líquido fecal de *Atta sexdens* (Capítulo 2), apresentaram atividade antimicrobiana contra fungos entomopatógenos e/ou antagonistas do fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus*. A presença desses compostos alterou os índices de germinação dos esporos fúngicos em todos os ensaios realizados (Figuras 2 a 8), e o peróxido apresentou maior potencial de inibição da germinação de esporos do que o ácido láctico.

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um composto inorgânico, metabólito de ocorrência natural na maioria dos organismos que recebe elétrons durante a reação de peroxidação, mediada pela enzima peroxidase. A peroxidase participa da oxidorredução dos ácidos graxos de cadeia curta removendo os átomos de H<sup>+</sup>, os quais são transferidos para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O oxigênio reativo contido no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é danoso a célula e, por isso, eficiente na inativação de microrganismos (ALBERTS et al., 2010; VIEIRA; BUENO, 2014). Um estudo conduzido por BOS et al. (2015) mostrou pela primeira vez que operárias da formiga *Formica fusca* alteram seus padrões de forrageamento quando expostas a fungos patogênicos a fim de aumentar a

quantidade de ROS em seu alimento. A maior ingestão de ROS mostrou aumentar a aptidão do hospedeiro, já que é prejudicial ao patógeno.

Para comprovar o potencial antimicrobiano do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, esse composto foi utilizado para o cultivo de *B. bassiana* em ensaio microbiológico e inibiu significativamente a germinação dos esporos (BOS et al., 2015). Na presente pesquisa testou-se a ação antimicrobiana do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no cultivo de cinco fungos: *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *T. harzianum*, *Syncephalastrum* sp. e *Escovopsis* sp., espécies fúngicas frequentemente encontradas em ninhos de formigas-cortadeiras. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em todos os ensaios inibiu totalmente a germinação dos esporos fúngicos na concentração 50mM. A inibição teve início na concentração 5mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que reduziu a quantidade de esporos germinados em aproximadamente 50% em quatro dos cinco fungos, com exceção do *T. harzianum* que apresentou redução de 50% na taxa de germinação nas menores concentrações (0,5 – 1mM) (Tabela 2).

O AL se mostrou menos eficiente na inibição dos esporos de *B. bassiana* quando comparado a ação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, já que na concentração 5mM inibiu apenas 16% da germinação (IG = 84%) (Figura 8). Mas, a concentração 20mM de AL utilizada nesse ensaio reduziu drasticamente o IG de 80% a 11%, o qual chegou a zero na concentração 50 mM de AL.

O ácido láctico é um composto orgânico simples que em sua forma não dissociada é capaz de atravessar a membrana celular microbiana reduzindo o pH intracelular e por isso apresenta atividade antimicrobiana (BARBOSA et al., 2011). Bactérias lácticas, como as do gênero *Lactobacillus*, presentes no trato digestório das formigas, produzem o ácido (HU et al., 2016; RAMALHO et al., 2017) e resultados anteriores sugerem que o ácido láctico presente no líquido fecal das formigas-cortadeiras e, também produzido pelo seu fungo simbionte desempenha importante papel na manutenção do pH do ninho (Capítulo 2 – item 4.3).

O fato do líquido fecal da formiga estudada apresentar baixa variação do pH (Capítulo 2 – item 4.3) sugere que o AL identificado nessa secreção pode estar na forma de tampão com o lactato de sódio. Sendo assim, o potencial antimicrobiano do tampão lactato de sódio pH 4 também foi testado contra o fungo *B. bassiana*. Os resultados indicam que o TL possui pouca ação antimicrobiana quando testado separadamente, já que pouco alterou a taxa de germinação dos esporos e em sua maior concentração (50mM) reduziu o IG a 40% (Figura 11). Entretanto, a presença de TL na placa de cultivo atrasou a germinação dos esporos, indicando que o produto interfere na germinação e pode desempenhar ação fungistática.

O teste realizado com a solução TL+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou os melhores resultados de inibição dos esporos de *B. bassiana*, inibindo totalmente a germinação na concentração 5 mM

(Figura 13). Evidencia que a ação sinérgica desses dois compostos no teste *in vitro* simula a composição do líquido fecal de *Atta sexdens*, já que estão presentes nessa secreção.

A utilização do tiosulfato de sódio (TS) nos testes de inibição dos esporos de *B. bassiana* comprovaram a hipótese de que o  $H_2O_2$  apresenta atividade antimicrobiana. O TS é um agente redutor capaz de neutralizar a ação do  $H_2O_2$ . Quando se utilizou TS+  $H_2O_2$  nas concentrações 10, 20 e 50 mM contra o fungo *B. bassiana*, os esporos germinaram semelhante ao controle, mostrando que o potencial do  $H_2O_2$  para inibir a germinação de esporos fúngicos foi reduzido pela presença do TS (Figura 14).

As operárias de *A. sexdens* estão frequentemente depositando as secreções da glândula mandibular e do líquido fecal no interior do ninho, seja durante a atividade de corte, da incorporação do material vegetal, do cultivo do fungo ou comportamento de limpeza. Pela primeira vez que está demonstrado que compostos presentes nessas secreções, como o ácido láctico e o peróxido de hidrogênio, apresentam ação antimicrobiana e são capazes de inibir *in vitro* a germinação de esporos de fungos patogênicos ou antagonistas do mutualista das formigas-cortadeiras. Portanto, participam da assepsia e na manutenção do pH no ninho. Outros estudos se fazem necessários para elucidar as rotas metabólicas desses compostos e seu modo de ação na inativação de microrganismos.

## 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.