

**ELANE BORBA ALVES**

**A GLÂNDULA METAPLEURAL DE FORMIGAS (HYMENOPTERA:  
FORMICIDAE) COM DIFERENTES ESTILOS DE VIDA: MORFOLOGIA E  
VOLATILÔMICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: José Eduardo Serrão

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa -  
Campus Viçosa

T

Alves, Elane Borba, 1998-

A474g  
2023

A glândula metapleural de formigas (Hymenoptera: Formicidae) com diferentes estilos de vida: morfologia e volatilômica / Elane Borba Alves. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (63 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Eduardo Serrão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Entomologia, 2023.

Referências bibliográficas: f. 52-63.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.714> Modo de acesso: World Wide Web.

1. Formigas - Morfologia. 2. Glândulas exócrinas.  
3. Análise cromatográfica. 4. Espectrometria de massa. I. Serrão, José Eduardo, 1965-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. III. Título.

CDD 22. ed. 595.796

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317


**ELANE BORBA ALVES**

**A GLÂNDULA METAPLEURAL DE FORMIGAS (HYMENOPTERA:  
FORMICIDAE) COM DIFERENTES ESTILOS DE VIDA: MORFOLOGIA E  
VOLATILÔMICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 16 de agosto de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 **ELANE BORBA ALVES**  
Data: 14/11/2023 14:37:39-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Elane Borba Alves**  
Autora

Documento assinado digitalmente  
 **JOSE EDUARDO SERRAO**  
Data: 14/11/2023 14:30:38-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**José Eduardo Serrão**  
Orientador

*Aos meus pais, Helena e Edmilson, e meus  
irmãos, Aline, Eduardo, Evanilson e Denilson.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meu pais, Maria Helena e Edmilson, e meus irmãos Aline, Eduardo, Evanilson e Denilson. Obrigada por todo o apoio e por sempre acreditarem em mim. Chegar até aqui só foi possível por causa de vocês.

Ao meu orientador José Eduardo Serrão, pelos ensinamentos e paciência, serei sempre grata por tudo que aprendi ao longo desses dois anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (403986/2021-4), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (APQ-02367-18, APQ-00856-19) pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Às minhas amigas e companheiras de jornada Paulinha e Erika. Obrigada pelas incontáveis horas de conversas e por toda a ajuda na realização deste trabalho, sou grata por ter amigas como vocês. Aos seus cônjuges, Antônio e Carlos pelo incentivo e pelas boas risadas.

À Taynara por ser a amiga compreensiva, e pelas sessões de cinema e chocolate quando sabia que eu tinha um dia exaustivo, e por todas as longas horas de boas risadas, obrigada por tudo. À Iuly, pelas risadas e por todas os momentos e histórias que compartilhamos.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial à Giovanna, Barbara, Lenise, ao Matheus Tudor, Matheus Soares, Amanda, Laryssa e Pedro. As pausas para o café sempre foram revigorantes durante esta jornada, apesar de não tomar café.

Ao meu amigo Samuel, que me ajudou muito, você é uma pessoa de luz e serei sempre grata por tudo.

Ao meu grande amigo Diego, que fez minhas análises e ainda teve paciência de explicar tudo, obrigada por ter sido minha graça salvadora, apesar de brigarmos a cada dois minutos.

Às minhas companheiras de república, Taynara, Verônica, Ana, Ramyris, Laura e Letícia, que me acolheram, obrigada por todo companheirismo e pelas incontáveis horas de conversa.

Ao laboratório de mirmecologia do Centro de estudos superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão, pela ajuda com material, em especial à Nayra, Claiane e ao Renato pela ajuda.

Às minhas grandes amigas e companheiras de sofrimento, Renata, Paula, Irany.

À Weslane e Gabriel por estarem comigo nessa jornada, vocês são pessoas maravilhas, sempre serei grata por conhecê-los.

Foram dois anos de muito aprendizado, onde conheci pessoas incríveis que vou levar pelo resto da vida, além do crescimento pessoal e profissional. Aprendi que o processo para conseguirmos alcançar nossos sonhos são dolorosos, porém o resultado faz tudo valer a pena. Obrigada a todos, serei eternamente grata aos meus familiares e amigos que acreditaram em mim quando eu mesma duvidei, essa conquista é nossa!!!!

*“Se você tem disposição para correr o risco, a vista do outro lado é espetacular”*

Grey's Anatomy

## RESUMO

ALVES, Elane Borba, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2023. **A glândula metapleural de formigas (Hymenoptera: Formicidae) com diferentes estilos de vida: Morfologia e volatilômica.** Orientador: José Eduardo Serrão.

As formigas possuem elevada riqueza de espécies, ocupando níveis tróficos diversos, além de possuírem múltiplas interações com outros organismos e comportamento eusocial. Estudos comparados da morfologia interna das subfamílias de formigas contribuem para a compreensão de sua filogenia e evolução. As formigas possuem uma gama de glândulas exócrinas, as quais produzem e armazenam secreções e as colocam para fora do corpo de forma controlada, dentre elas, as glândulas metapleurais são exclusivas destes insetos, sendo considerada uma sinapomorfia de Formicidae. Assim, o conhecimento da morfologia da glândula metapleural nas espécies de formigas é fundamental para compreensão da origem da eusocialidade destes insetos. O presente estudo comparou a morfologia e volatilômica das glândulas metapleurais de *Paraponera clavata* (Paraponerinae), *Pachycondyla crassinoda* (Ponerinae) e *Atta sexdens* (Myrmicinae) que possuem diferentes estilos de vida, contribuindo para a compreensão de aspectos evolutivos e comportamentais das formigas. As glândulas metapleurais foram analisadas com microscopia de luz e cromatografia de fase gasosa acoplada com espectrometria de massas. Os resultados revelaram que a anatomia das glândulas metapleurais de *P. clavata* e *P. crassinoda* possuem poucas diferenças em relação ao tamanho, forma, coloração, além de apresentarem uma diferença em relação ao orifício da abertura da glândula. A histologia e histoquímica das glândulas metapleurais das três espécies são semelhantes ao encontrado em outras espécies de formigas. Os resultados mostram que o número de células e o tamanho do reservatório são maiores na espécie arborícola, *P. clavata*, e menor em *P. crassinoda* e *A. sexdens* com hábitos terrestres. Apesar de *A. sexdens* possuir menores número de células, área celular e reservatório, a glândula apresenta alta taxa de atividade metabólica, enquanto *P. crassinoda* possui um número de células maior que *A. sexdens*, e apresenta menor atividade metabólica, mas possui a mesma capacidade de secreção de substâncias. Provavelmente o tamanho da glândula e atividade metabólica *P. clavata*, *P. crassinoda* e *A. sexdens* está associada à sua interação com microrganismos patogênicos. Os compostos químicos identificados nas glândulas metapleurais de *P. clavata* e *P. crassinoda* indicam sua natureza antimicrobiana, além de demonstrar que as duas espécies possuem químicos semelhantes. Alguns compostos identificados neste estudo são o primeiro registro

para as formigas, ou para os insetos, tais como Dodecane, n-Docosanol, Heptadecano 9-hexil-, Tetracosano 11-decil- e Decano. Em conclusão, os aspectos morfológicos possuem algumas diferenças, demonstrando que o estilo de vida destes indivíduos são provavelmente o fator decisivo, além de demonstrar a semelhança química em *P. clavata* e *P. crassinoda*.

Palavras-chave: Células. Compostos químicos. Morfometria. Atividade Antimicrobiana.

## ABSTRACT

ALVES, Elane Borba, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2023. **Metapleural gland of ants (Hymenoptera: Formicidae) with different lifestyles: Morphology and volatilomics.** Adviser: José Eduardo Serrão.

Ants have a high species richness, occupying different trophic levels, in addition to having multiple interactions with other organisms and eusocial behavior. Comparative studies of the internal morphology of ant subfamilies contribute to the understanding of their phylogeny and evolution. Ants have a range of exocrine glands, which produce and store secretions and release them out of the body in a controlled manner. Among them, the metapleural glands are exclusive to these insects, being considered a synapomorphy of Formicidae. Thus, knowledge of the morphology of the metapleural gland in ant species is fundamental to understanding the origin of eusociality in these insects. The present study compared the morphology and volatilomics of the metapleural glands of *Paraponera clavata* (Paraponerinae), *Pachycondyla crassinoda* (Ponerinae) and *Atta sexdens* (Myrmicinae) that have different lifestyles, contributing to the understanding of evolutionary and behavioral aspects of ants. The metapleural glands were analyzed with light microscopy and gas chromatography coupled with mass spectrometry. The results revealed that the anatomy of the metapleural glands of *P. clavata* and *P. crassinoda* have few differences in relation to size, shape, color, in addition to presenting a difference in relation to the opening of the gland. The histology and histochemistry of the metapleural glands of the three species are similar to that found in other ant species. The results show that the number of cells and the size of the reservoir are higher in the arboreal species, *P. clavata*, and lower in *P. crassinoda* and *A. sexdens* with terrestrial habits. Although *A. sexdens* has a smaller number of cells, cell area and reservoir, the gland has a high rate of metabolic activity, while *P. crassinoda* has a greater number of cells than *A. sexdens*, and has a lower metabolic activity, but has the same ability to secrete substances. Probably the size of the gland and metabolic activity of *P. clavata*, *P. crassinoda* and *A. sexdens* is associated with their interaction with pathogenic microorganisms. The chemical compounds identified in the metapleural glands of *P. clavata* and *P. crassinoda* indicate their antimicrobial nature, in addition to demonstrating that the two species have similar chemicals. Some compounds identified in this study are the first records for ants or insects, such as Dodecane, n-Docosanol, Heptadecane 9-hexyl-, Tetracosane 11-decyl- and Decane. In conclusion, the morphological aspects have some differences, demonstrating that the lifestyle

of these individuals is probably the decisive factor, in addition to demonstrating the chemical similarity in *P. clavata* and *P. crassinoda*.

Keywords: Cells. Chemical compounds. Morphometry. Antimicrobial activity.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
2.1. <i>Material biológico</i> .....	16
2.2. <i>Anatomia da abertura da glândula e da glândula metapleural</i> .....	16
2.3. <i>Microscopia de luz</i> .....	16
2.4. <i>Histoquímica</i> .....	17
2.5. <i>Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas</i> .....	18
2.6. <i>Análises estatísticas</i> .....	18
3. RESULTADOS .....	20
3.1. <i>Anatomia da abertura da glândula e da glândula metapleural</i> .....	20
3.2. <i>Histologia</i> .....	24
3.3. <i>Histoquímica</i> .....	24
3.5. <i>Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas</i> .....	36
4. DISCUSSÃO .....	41
4.1. <i>Morfologia</i> .....	41
4.2. <i>Volatilômica</i> .....	46
5. CONCLUSÃO.....	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

As formigas consistem em um grupo de indivíduos que pertencem aos Formicidae composta por 16 subfamílias, 346 gêneros, 17.190 espécies (AntWeb, 2023). Esses insetos são abundantes, com uma elevada riqueza de espécies, ocupando níveis tróficos diversos, possuem múltiplas interações com outros organismos (Morreau e Bell, 2013; Baccaro et al., 2015) e comportamento eusocial por apresentarem características bem definidas como sobreposição de gerações, divisão de trabalho e cuidado com a prole (Wilson e Hölldobler, 2005).

Esses organismos, compreendem 15-20% da biomassa animal total em muitos ecossistemas e, portanto, atuam como principais condutores de energia e matéria orgânica (Ward, 2014). As formigas exibem estratégias adaptativas notáveis e especializações incluindo cultivo de fungos, coleta de sementes, pastoreio, "ordenha" de outros invertebrados, construção de ninhos comunais, predação cooperativa, parasitismo social e escravidão (Baccaro et al., 2015).

Importantes na formação do solo, as formigas que forrageiam epigeicamente são responsáveis pelos processos de mineralização do solo (Gunadi e Verhoef, 1993). Formigas que forrageiam na copa de árvores (arbóreas) fornecem proteção contra herbívoros, atacando e repelindo inimigos naturais da planta (Lapola et al., 2004). Formigas que forrageiam no solo e subsolo (hipogeicas) têm participação direta ou indireta na manutenção dos ciclos bioquímicos, físicos e biológicos devido à movimentação de grandes quantidades de solo (Baccaro et al., 2015).

Uma característica notável das formigas é o comportamento eusocial, caracterizado pela ocorrência de castas bem definidas que apresentam diferentes morfologias e comportamentos (Peeters, 2019; Fernandez et al., 2021). As colônias de formigas são compostas usualmente pela rainha permanentemente sem asas (difere morfologicamente das

demais em algumas subfamílias), rainhas virgens aladas, operárias, machos (geralmente ficam pouco tempo na colônia), larvas e pupas (Peeters, 2019).

Considerando a diversidade de espécies, de comportamento e de habitats ocupados pelas formigas, estes insetos são usados como modelos para estudos de evolução, ecologia e monitoramento de ecossistemas perturbados (Fernandez et al., 2021). Portanto, o estabelecimento de uma filogenia robusta é fundamental para se ter uma base sólida para sua sistemática e taxonomia (Branstetter et al., 2017). Estudos atuais sobre a filogenia das formigas se concentram na análise de caracteres da morfologia externa (Fernández et al., 2019) e moleculares (Branstetter et al., 2017; Fernandez et al., 2021) para elucidar a evolução desses organismos ao longo da história. Porém, dados da morfologia interna das formigas podem contribuir para o estabelecimento de relações filogenéticas e elucidação de dúvidas sobre a evolução destes insetos.

Atualmente a filogenia das formigas inclui Paraponerinae e Ponerinae como grupos-irmãos e Myrmicinae em um grupo diferente (Fernandez et al., 2021). Paraponerinae possui diferença morfológica em relação as operárias de acordo com a divisão de trabalho, ou seja, as operárias menores cuidam das pupas e larvas, e as maiores são soldados que protegem o ninho e as operárias forrageadoras, com tamanho corpóreo superior a 2 cm (Delsinne et al., 2019). *Paraponera clavata* (Fabricius, 1775) é a única espécie vivente pertencente a esta subfamília (Delsinne et al., 2019; Fernández et al., 2019).

Em representantes de Ponerinae, a rainha é morfologicamente semelhante às operárias, que em geral, não apresentam um sistema sofisticados de castas, e forrageiam solitariamente em busca de recursos alimentares (Fernández e Guerrero, 2019). Dentre as Ponerinae, *Pachycondyla crassinoda* (Latreille, 1802) possui o maior tamanho corpóreo entre as espécies da subfamília para o novo mundo (Mackay e Mackay, 2010).

Myrmicinae inclui os representantes de Attini que possuem um complexo sistema de comunicação, divisão do trabalho e polimorfismo (Wilson, 1980; Caetano et al., 2002; Mehdiabadi e Schultz, 2009; Della Lucia e De Souza, 2011; Della Lucia et al., 2014). As espécies do gênero *Atta* apresentam polimorfismo nas operárias, com uma divisão de subcastas, em que, as operárias maiores (“soldados”) são especializadas na defesa da colônia, as operárias médias em forrageamento e as operárias menores trabalham dentro da colônia (Holldobler e Wilson, 1990; Lacerda et al., 2010; Wilson, 1980).

A complexa organização social das formigas necessita de um sistema de comunicação eficiente entre os indivíduos da colônia, o que geralmente envolve os produtos liberados por glândulas exócrinas (Billen e Morgan, 1998; Hölldobler e Wilson, 1990). Atualmente, são reconhecidas cerca de 84 glândulas exócrinas nas formigas (Billen e Sobotník, 2015), as quais produzem e armazenam secreções e as liberam de forma controlada (Caetano et al., 2002). A diversidade e abundância dessas glândulas condizem com as várias funções que suas secreções desempenham durante o ciclo de vida desses indivíduos (Noirot, 1969; Jackson e Morgan, 1993).

Dentre as glândulas exócrinas, as glândulas metapleurais são consideradas sinapomorfias para as formigas, embora não sejam encontradas em poucas espécies arborícolas (Brown, 1968; Hölldobler e Engel-Siegel, 1984), porém uma glândula homóloga foi descrita para a vespa parasitoide *Pelecinus polyturator* (Hymenoptera: Pelicinidae) (Ulmer et al., 2023). Assim, dados sobre as glândulas metapleurais podem ser fundamentais para compreensão da origem da eusocialidade das formigas (Hölldobler e Wilson 1990; Tranter et al., 2015). Essa glândula ocorre em par na região postero-lateral do metatórax, formada por um grupo de células secretoras que libera a secreção através de canalículos em um par de reservatórios abaixo do tegumento (Junqueira e Diehl, 2014; Pech e Billen, 2017). As secreções produzidas pelas glândulas metapleurais estão ligadas à imunidade dos indivíduos

da colônia com efeito antibiótico (Maschwitz et al., 1970; Beattie et al., 1986; Tragust, 2016), além do reconhecimento coespecífico, marcação de território e defesa contra predadores e competidores (Jaff e Puch 1984; Penick et al., 2018).

A composição, função da secreção e efeito antimicrobiano da glândula metapleurais em formigas são reportados para representantes de Myrmicinae, incluindo *Crematogaster defformis* Smith, 1857 (Attygalle et al., 1989), *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, *Atta cephalotes* (Linnaeus, 1758) (Nascimento et al., 1996) e *Acromyrmex octospinosus* (Reich, 1793) (Nascimento et al., 1996; Ortius-Lechner et al., 2000; Ortius-Lechner et al., 2003; Yek et al., 2012). No entanto poucos estudos buscam comparar a morfologia das glândulas metapleurais entre espécies que ocupam nichos diversos.

O presente estudo tem como objetivo comparar a morfologia e os compostos químicos das glândulas metapleurais entre *P. clavata* (Paraponerinae), *P. crassinoda* (Ponerinae) e *A. sexdens* (Myrmicinae) que possuem diferentes estilos de vida, contribuindo para a compreensão de aspectos evolutivos e comportamentais das formigas. Para tanto, serão avaliadas as seguintes hipóteses:

I- Os aspectos morfológicos diferem entre as três espécies estudadas.

II- O número de células secretoras e o reservatório são menores em espécies com habitat arborícola.

III- Os compostos químicos entre as espécies diferem de acordo com o estilo de vida dos indivíduos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material biológico**

Operárias de *P. clavata* e *P. crassinoda* foram coletas manualmente em duas localidades no município de Caxias, estado do Maranhão, sendo elas: o povoado Condave (5° 00' S 43° 25' O) e a Área de proteção Ambiental Municipal do Inhamum (4° 53' S 43° 24' O), e as operárias de *A. sexdens*, foram coletadas na Universidade Federal de Viçosa, estado de Minas Gerais (20° 45' S 42° 52' O). As operárias foram transferidas vivas para o fixador glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2.

### **2.2. Anatomia da abertura da glândula e da glândula metapleurais**

Nove operárias de cada uma das espécies, *P. clavata*, *P. crassinoda* e *A. sexdens*, tiveram a largura da cabeça (HW), no ponto mais largo medida (Bulova et al., 2016) como indicação do tamanho do indivíduo, utilizando estereomicroscópio STEMI 2000-C ZEISS (para melhor compreensão esta medida será citada a partir de agora como distância interocular). A seguir as operárias de *P. clavata*, *P. crassinoda* foram dissecadas para obtenção de secções do metatórax e glândula metapleurais, e em seguida colocadas em microtubo com 2 mL de etanol a 95%. Posteriormente, as amostras foram analisadas e fotografadas em Estereomicroscópio Trinocular (ZEISS SteREO Discovery.V20). As medidas de comprimento e largura da glândula metapleurais e do orifício de saída foram realizadas com auxílio do programa de computador AxioVision (Special Edition 64 bit, Release 4.9).

### **2.3. Microscopia de luz**

Nove operárias de *P. clavata*, *P. crassinoda* e *A. sexdens* foram dissecadas e as glândulas metapleurais desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) com 15 min de intervalo cada uma. Após a desidratação as amostras foram incluídas em historesina (Leica) de acordo com as instruções do fabricante. Secções com 3 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo Leica RM 255, coradas com hematoxilina (20 min) e

eosina (30 s) e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 com câmera Olympus QColor 3 acoplada. Posteriormente, o número de células secretoras nas glândulas metapleurais de cada espécie foi contado a partir dos cortes histológicos. A seguir, foram contadas e numeradas as secções histológicas dos nove indivíduos de cada espécie, posteriormente sorteamos cinco secções histológicas aleatórias da glândula metapleural, utilizando o Sorteador.com, sendo 45 secções por espécie, e totalizando 135 utilizadas para realização das medidas de área do reservatório, das células secretoras, do núcleo e realização do cálculo da razão núcleo/citoplasma. As medidas foram realizadas utilizando o software ImageJ.

#### **2.4. Histoquímica**

Algumas secções da glândula metapleural, obtidas como descrito acima, foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos: mercúrio-bromofenol para detecção de proteínas totais (Pearse, 1953), ácido periódico de Schiff (PAS) para detecção de glicoproteínas e carboidratos neutros (Bancroft e Gamble, 2008); e azul do Nilo para detecção de lipídios ácidos e neutros (Bancroft e Gamble, 1986). Em seguida as amostras foram analisadas e fotografadas conforme descrito na microscopia de luz. Foram obtidas 27 imagens para cada teste, totalizando 81 imagens, utilizadas para quantificação de proteínas, carboidratos e lipídios utilizando o software ImageJ. As imagens foram convertidas de cores RGB (sigla para red, green e blue ou em português vermelho, verde e azul, a coloração primária de uma foto é a mistura destas três cores primárias) para escala de cinza. Em cada imagem foram selecionadas cinco áreas aleatórias de 32x32 pixels para análise de intensidade dos valores de cinza nas imagens (Ustadt, 2022). Para estas análise, foram utilizados os seguintes comandos no software: > Analyze > Set measurements > (marque: Area, Standard deviation, Min & max gray value, Mean gray value). Em seguida a imagem foi selecionada: > File > Open, convertida de RGB para a escala de cinza: Image > Type > 32-bit.

Posteriormente, foi realizada conversão da imagem para negativo: > Edit > Invert (Ctrl+Shift+i). Uma área quadrada com dimensões de 32x32 pixels foi selecionada: > Edit > Selection > Specify > Width: 32, Height: 32 (Para cada imagem, foram selecionados cinco campos nas áreas de interesse). Em seguida, Ctrl + M para adquirir os valores, que foram transferidos para tabela e posteriormente submetidos a testes estatísticos.

### **2.5. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**

Para *A. sexdens* não foi feita realizada esta análise, pois trabalhos similares são relatados para esta espécie. Para a análise dos compostos produzidos pela glândula metapleural, cinco operárias de *P. clavata* e *P. crassinoda* foram manualmente coletadas, imobilizadas a frio e dissecadas para a retirada das glândulas metapleurais, que foram transferidas para microtubo com 0,50 mL de hexano a 95%, durante 10 minutos, posteriormente as glândulas foram retidas. A seguir, as amostras foram analisadas em cromatógrafo de fase gasosa (Shimadzu GCMS-QP5050A), coluna capilar SPB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25µm), com uma temperatura inicial de 40 °C (2 min), aquecimento gradual até 300 °C com taxa de 20 °C/min, permanecendo nesta temperatura por 25 min. Gás de arraste: hélio, fluxo de 1,6 mL/min, modo splitless, temperatura do injetor: 290°C e volume de injeção: 1,0 µL. Para a detecção utilizou-se o método por impacto de elétrons (70 eV), modo scan com tempo de corte de solvente de 5 minutos e os espectros de massas foram obtidos em uma faixa de 35–700 (m/z).

### **2.6. Análises estatísticas**

Os dados de distância interocular, área do reservatório e das células, assim como das densidades de pixels dos testes histoquímicos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade seguido do teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias entre as amostras. A seguir os dados de área das células e do reservatório da glândula metapleural foram comparados por análise de variância (ANOVA). Os dados de

distância interocular e densidades de pixels dos testes histoquímicos foram analisados com um modelo linear generalizado com distribuição gamma, seguindo-se comparação pelo teste de Bonferroni. A relação entre a área das células e a distância interocular em cada uma das três espécies de formiga foi analisada pela correlação de Spearman. Todas as análises foram executadas utilizando o software estatístico R, com nível de significância de 5%.

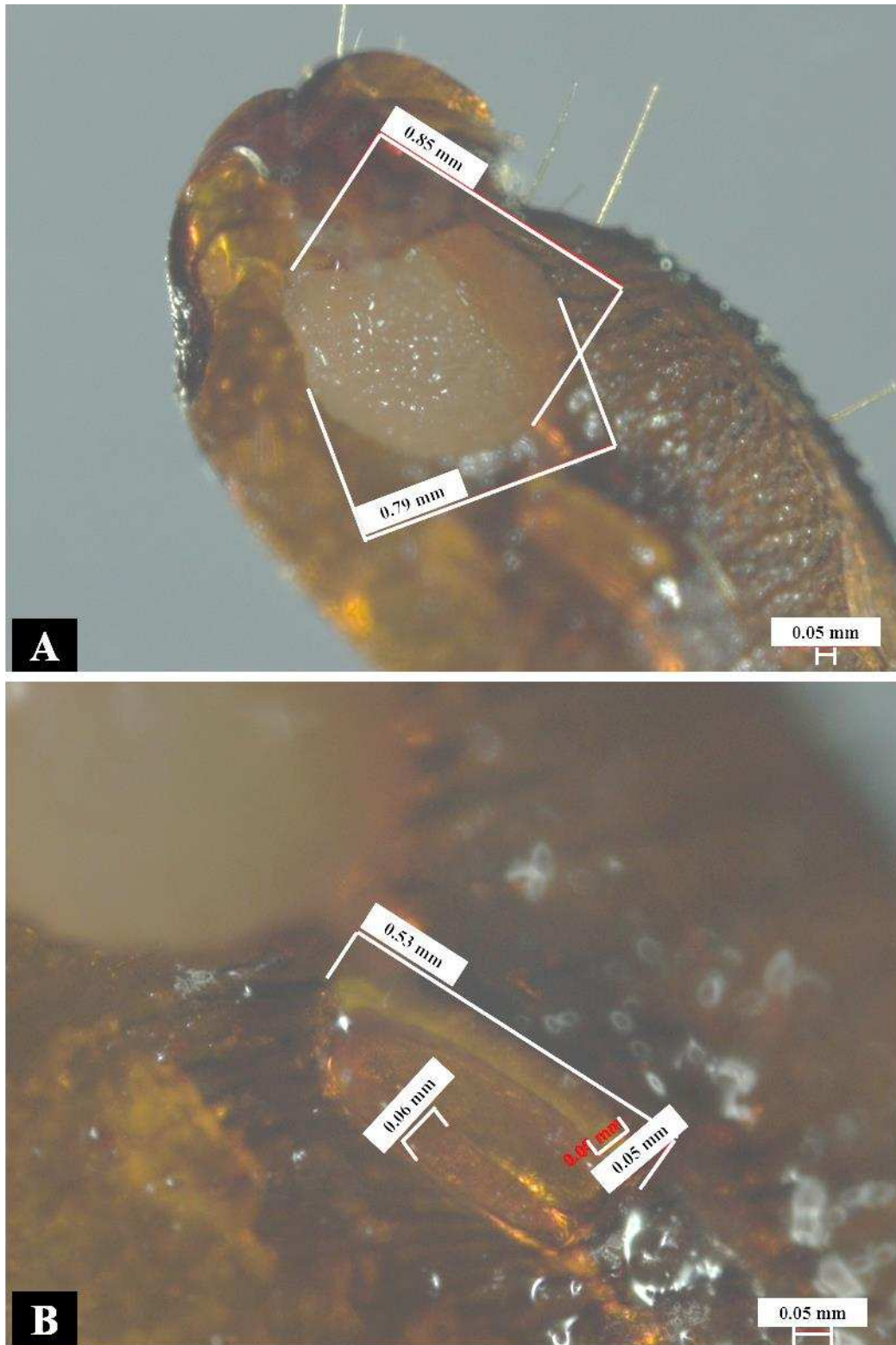
### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Anatomia da abertura da glândula e da glândula metapleural

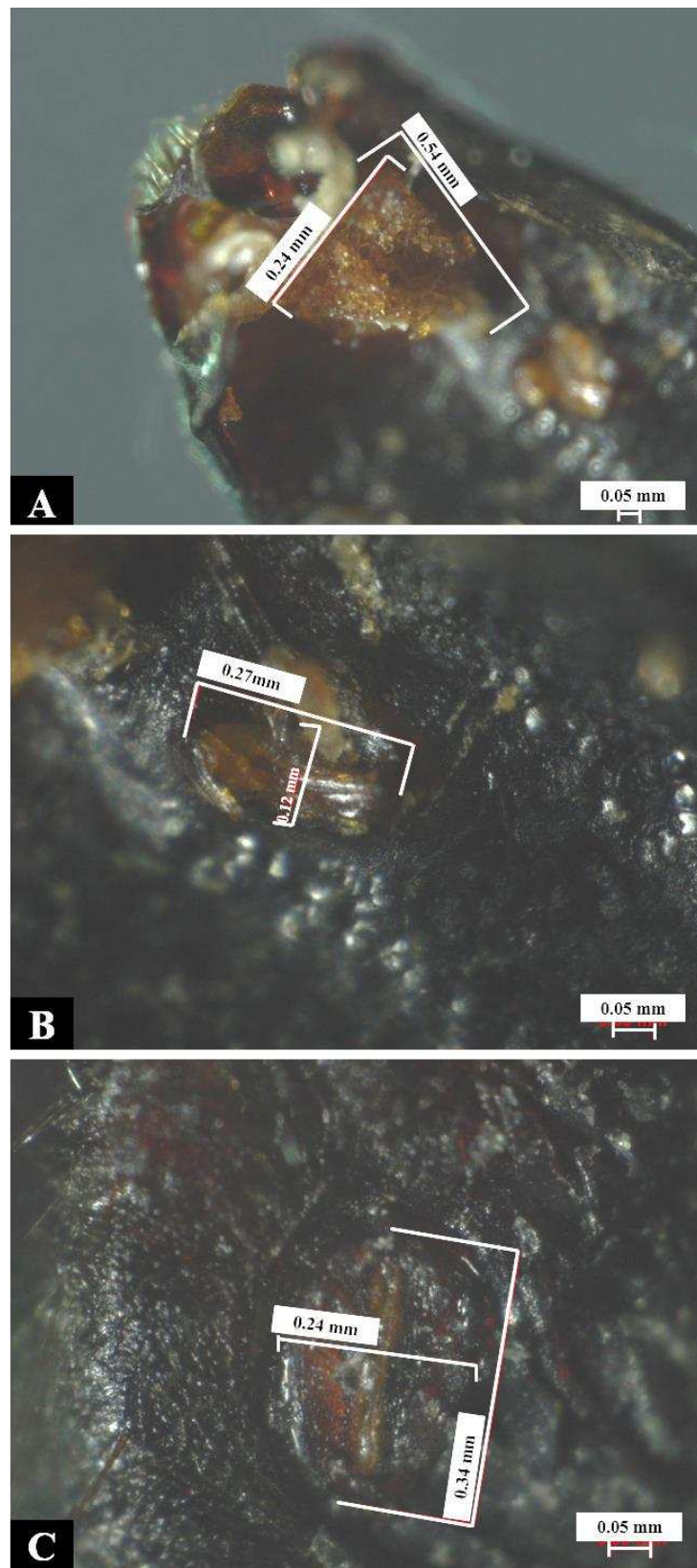
Para *A. sexdens* não foi possível a retirada da glândula metapleural por apresentarem um tamanho pequeno e ser difícil a retirada completa da glândula. A anatomia da glândula metapleural de *P. clavata* e *P. crassinoda*, mostra a ocorrência de aglomerados de células secretoras, sendo a de *P. clavata* com formato de couve-flor (Fig. 1-A) e a de *P. crassinoda* com formato de dois cachos (Fig. 2-A). Em relação ao comprimento e largura desses aglomerados celulares, o de *P. clavata* possui 0.85 mm e 0.79 mm (Fig. 1-A) e *P. crassinoda* 0.54 mm e 0.0.24 mm (Fig. 2-A).

As células secretoras apresentaram coloração branca em *P. clavata* (Fig. 1-A), e amarela amarronzada *P. crassinoda* (Fig. 2-A) em presença da solução tampão utilizada para dissecação. O reservatório da glândula não foi aparente, pois está totalmente envolto pelas células secretoras em ambas as espécies (Fig. 1-A e 2-A). A abertura da glândula metapleural do lado interno, apresentou uma projeção da cutícula com 0.05 mm de altura, composta de dois lados iguais com 0.06 mm, com comprimento de 0.53 mm em *P. clavata* (Fig. 1-B). Para *P. crassinoda* o lado interno da abertura não apresentou projeções da cutícula, porém mostrou estrutura semelhante, com dois lados iguais com 0.06 mm cada, e uma largura total de 0.12 mm, e com 0.27 mm de comprimento (Fig. 2-B).

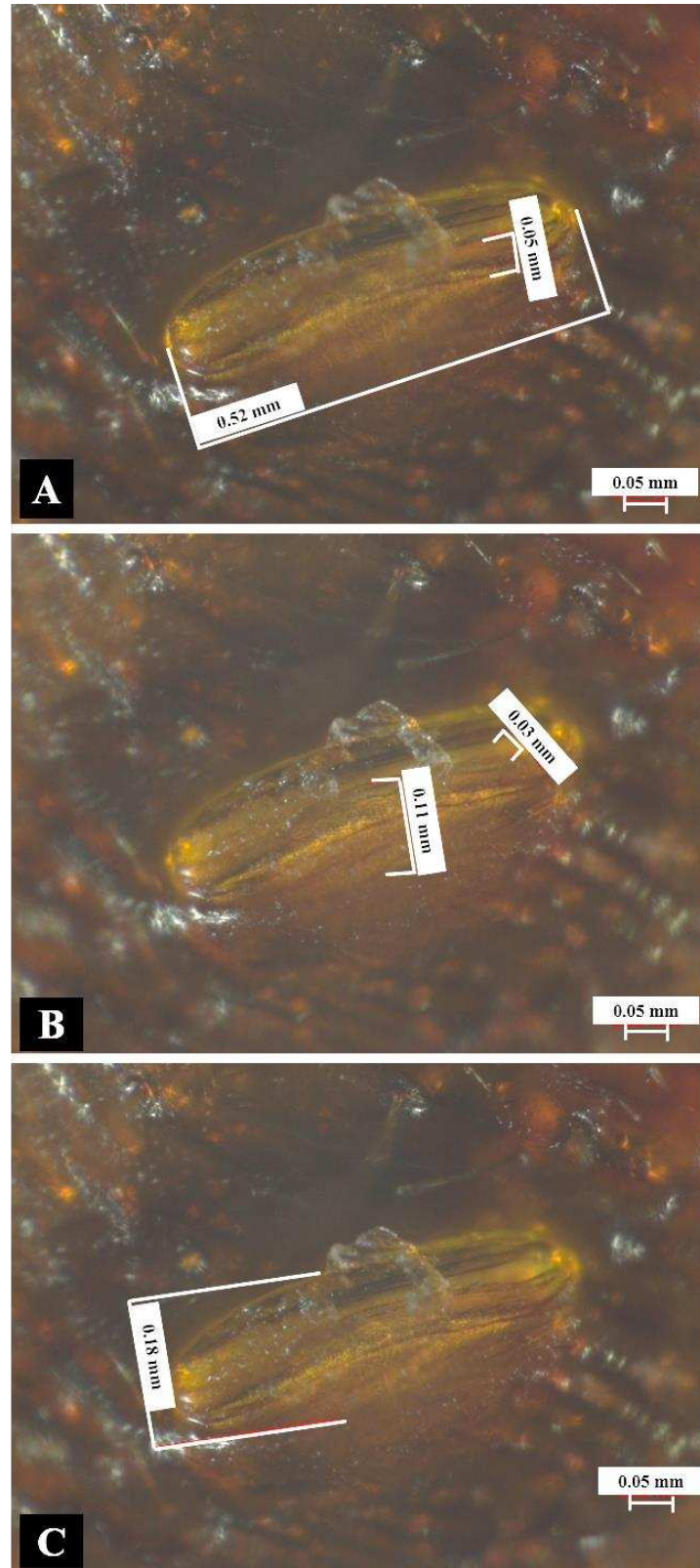
Em *P. crassinoda* os dois lados que formam a abertura externa são largos, com 0.12 mm cada e largura total de 0.24 mm, com o comprimento de 0.34 mm (Fig.2-C). O lado externo da abertura da glândula metapleural em *P. clavata* é formado por dois lados com 0.05 mm e comprimento de 0.52 mm (Fig. 3-A), apresentando uma projeção da cutícula com 0.11 mm de altura com um pequeno espaço de 0.03 mm entre os dois lados que compõem a abertura (Fig. 3-B), e com largura de 0.18 mm (Fig. 3-C).



**Figura 1.** Anatomia da glândula metapleural e lado interno da abertura de *Paraponera clavata*. **A.** Glândula metapleural com as medidas de largura (0.79 mm) e comprimento (0.85 mm). **B.** Abertura pelo lado interno, com medidas de comprimento (0.53 mm), largura de um dos lados (0.06 mm) e sua altura (0.05 mm).



**Figura 2.** Anatomia da glândula metapleural e sua abertura de *Pachycondyla crassinoda*. **A.** Medidas de largura e comprimento (0.47 e 0.54 mm). **B.** Lado interno mostrando as medidas de comprimento (0.27 mm) e largura de um dos lados (0.06 mm). **C.** Lado externo da abertura, mostrando comprimento de 0.34 mm e largura de 0.24 mm, com os dois lados, tendo 0.06 mm cada.



**Figura 3.** Anatomia do lado externo da abertura da glândula metapleural de *Paraponera clavata*. **A.** Imagem mostrando as medidas de comprimento (0.52 mm) e a largura de um dos lados externos (0.05 mm). **B.** Projeção da abertura externa relação a cutícula, com altura de 0.11mm. **C.** Largura total da abertura externa (0.18 mm).

### 3.2. Histologia

As glândulas metapleurais de *A. sexdens*, *P. crassinoda* e *P. clavata* foram encontradas em pares, localizados na região do metatórax. O formato da glândula metapleural difere entre as espécies, sendo formada por células alongadas em *A. sexdens* (Fig. 4-A), em formato de dois cachos em *P. crassinoda* (Fig. 5-A), e em forma de couve-flor em *P. clavata* (Fig. 6-A). Elas são constituídas por uma camada de células secretoras, com canalículos que conectam o interior da célula ao reservatório por placas crivadas (Fig. 4-A, 5-A, 6-A).

Em relação ao formato das células, em *A. sexdens* elas apresentaram aspecto alongado e com núcleos esféricos (Fig. 4-C). Em *P. crassinoda* e *P. clavata* as células e os núcleos foram esféricos (Fig. 5-A, 6-A). *Paraponera clavata* apresentara células secretoras com núcleos com predomínio de eucromatina e nucléolos evidentes (Fig. 6-B), enquanto em *Atta sexdens* e *P. crassinoda* os nucléolos foram menos abundantes (Fig. 4-B, 5-B).

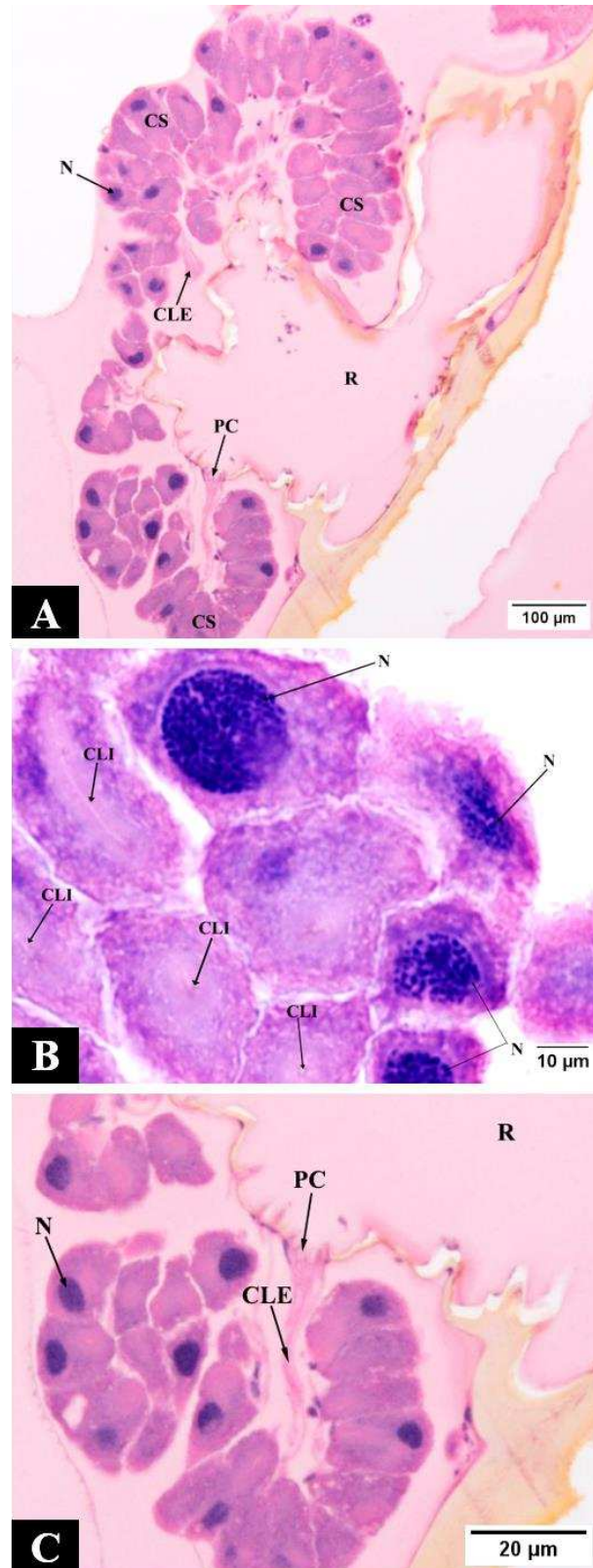
O reservatório da glândula metapleural foi delimitado por uma fina cutícula em todas as espécies (Fig. 4-C, 5-A, 6-C). O número de placas crivadas que caracterizam as aberturas dos canalículos que liberam a secreção da glândula metapleural no reservatório, foi de sete em *A. sexdens* e *P. clavata* e uma em *P. crassinoda*.

### 3.3. Histoquímica

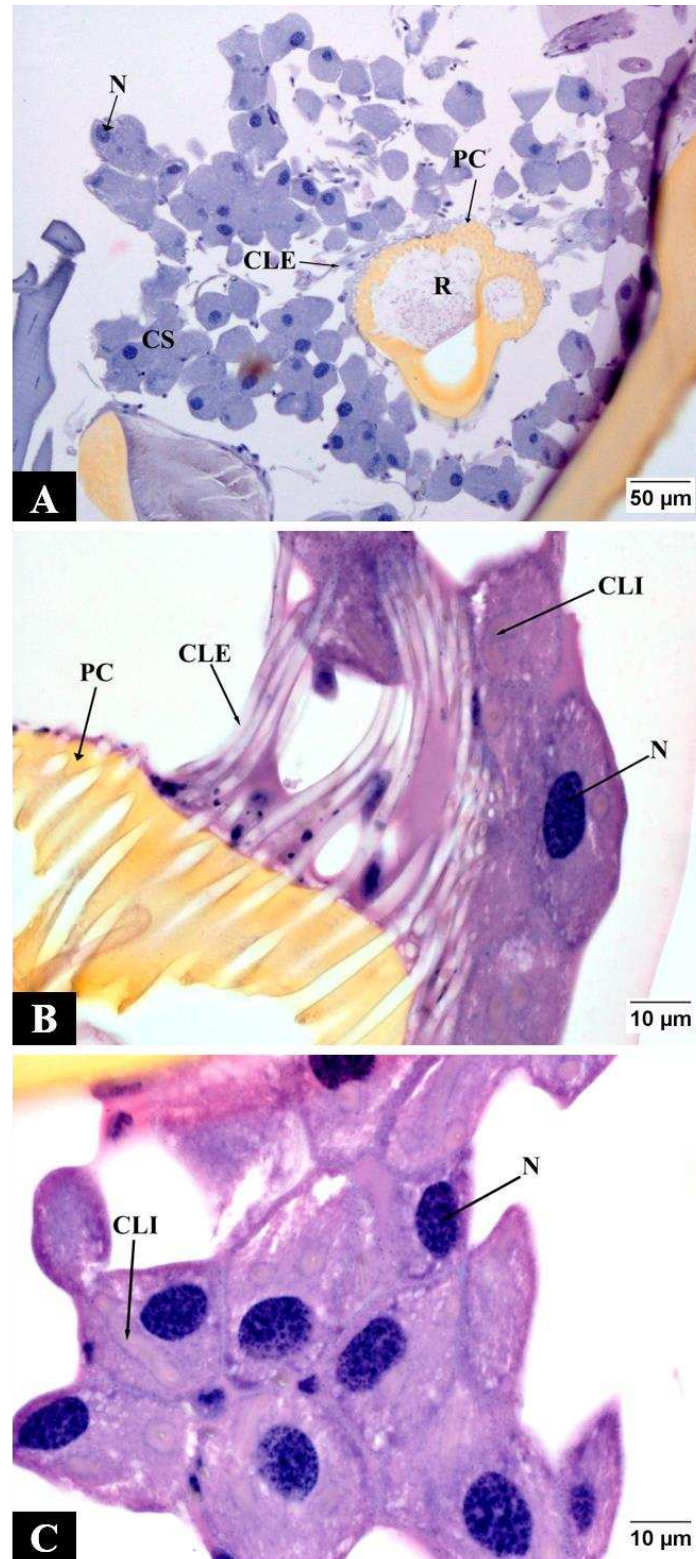
O teste para detecção de proteínas totais, revelou forte reação nas três espécies (Fig. 7), tendo resultados similares em relação à intensidade de pixels ( $p > 0,05$ ), demonstrando que não há diferenças significativas.

O teste histoquímico para a detecção de glicoproteínas e carboidratos neutros evidenciou que as células secretoras da glândula metapleural em *A. sexdens*, possuem uma reação mais intensa marcante (Fig. 8-A) que àquela em *P. crassinoda* e *P. clavata* (Fig. 8-B e C), porém as análises estatísticas demonstram que não há diferença significativa entre as três espécies ( $p > 0,05$ ).

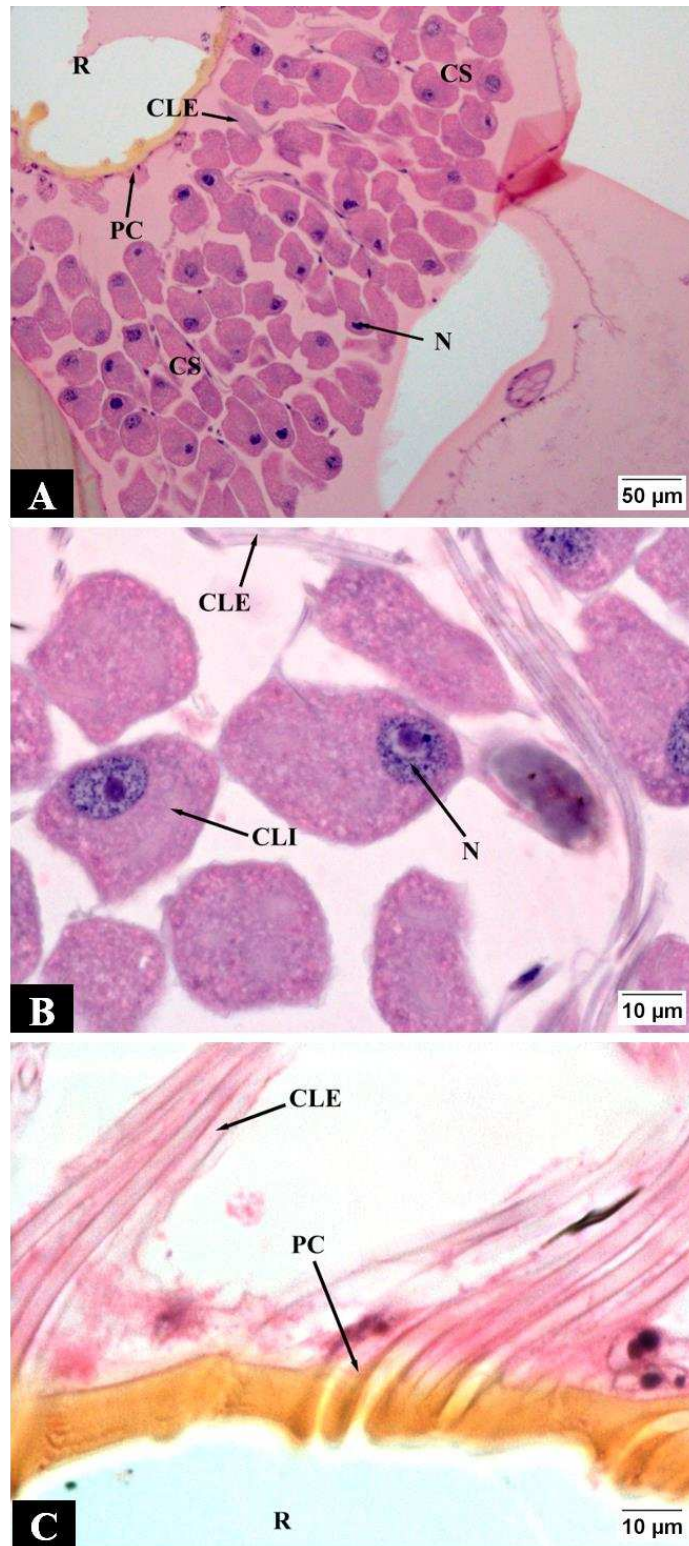
A detecção de lipídios ácidos e neutros evidenciou fraca reação nas células secretoras das três espécies (Fig. 9), mas as análises estatísticas demonstram que *A. sexdens* apresenta maior quantidade de lipídios que *P. crassinoda* ( $p < 0,05$ ), *P. clavata* não apresentou diferença em relação as demais espécies ( $p > 0,05$ )



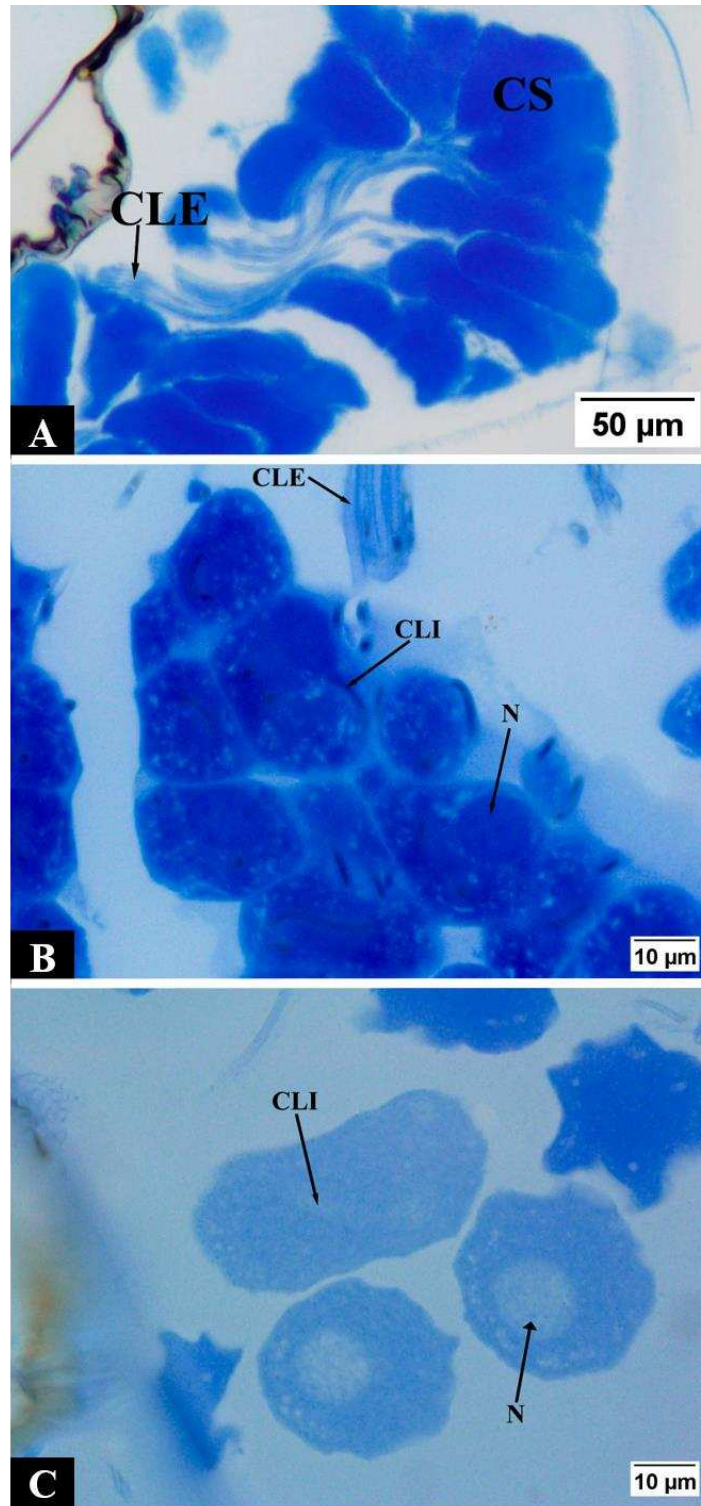
**Figura 4.** Micrografias de luz da glândula metapleural de *Atta sexdens*. **A.** Secção histológica mostrando a glândula metapleural, com a camada secretora (CS). **B.** Secção histológica das células, evidenciando o núcleo (N) e os canalículos intracelulares (CLI). **C.** Secção histológica evidenciando a placa clivada (PC), canalículos extracelulares (CLE) e o reservatório (R).



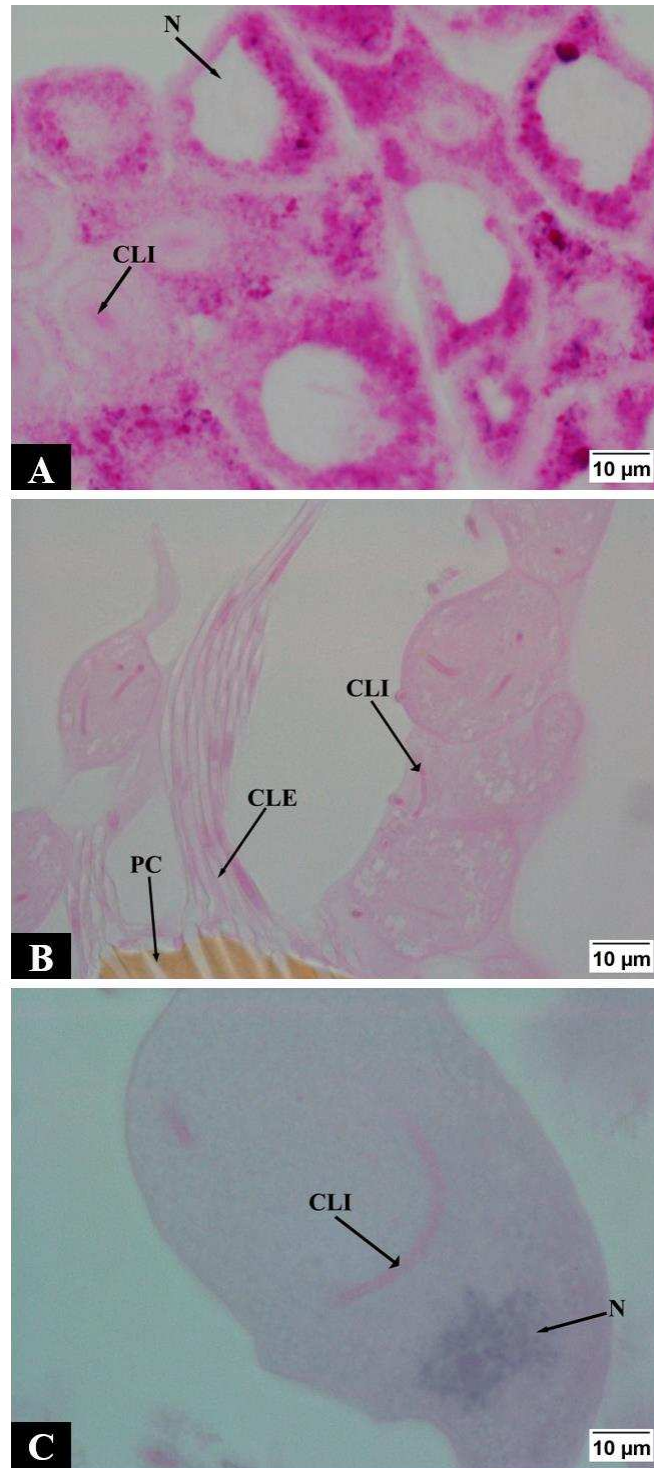
**Figura 5.** Micrografias de luz glândula metapleural de *Pachycondyla crassinoda*. **A.** Secção histológica mostrando a glândula metapleural, com a camada secretora (CS) e o início do reservatório (R). **B.** Secção histológica das células, evidenciando o núcleo (N), placa clivada (PC) e canálculos extracelulares (CLE) **C.** Secção histológica evidenciando os canálculos intracelulares (CLI) e o núcleo (N).



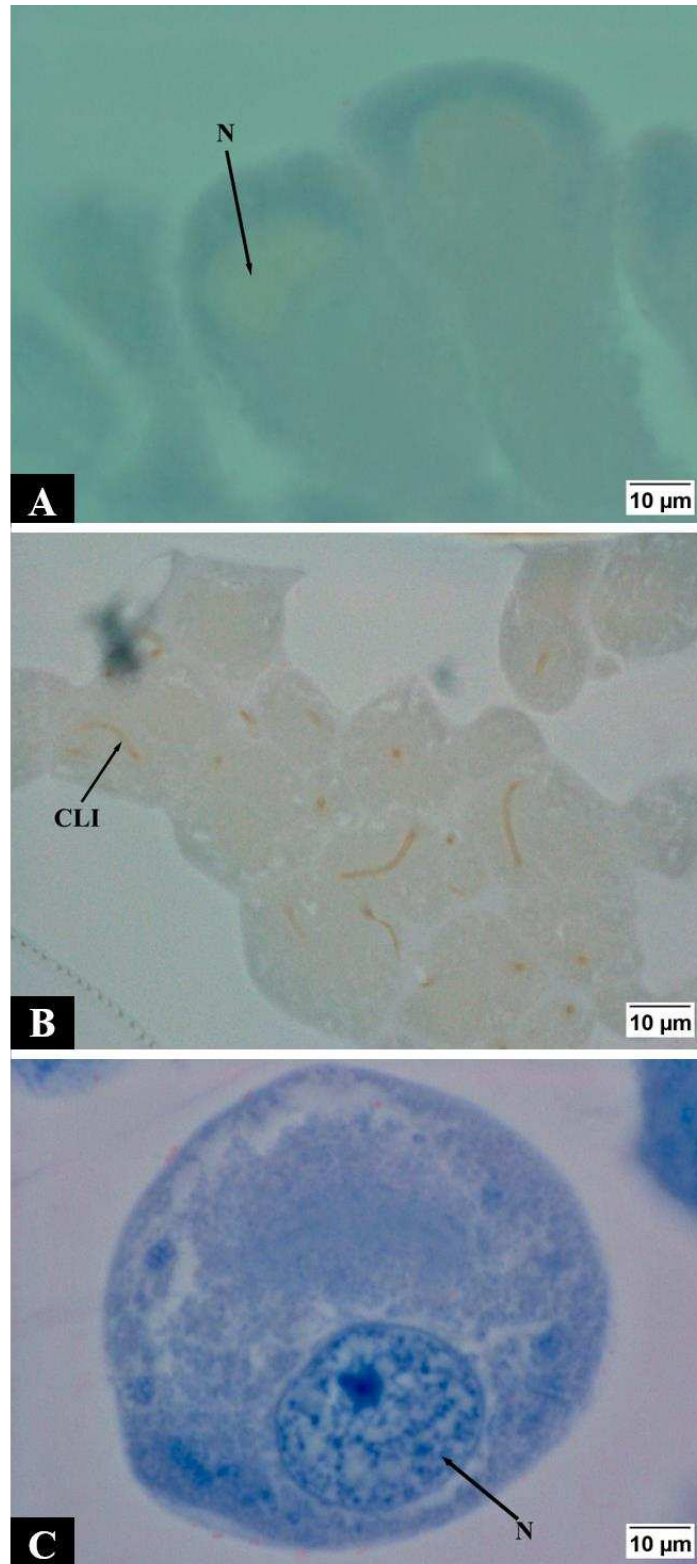
**Figura 6.** Micrografias de luz da glândula metapleural de *Paraponera clavata*. **A.** Secção histológica mostrando a glândula metapleural, com a camada secretora (CS) e o reservatório (R). **B.** Secção histológica das células, evidenciando o núcleo (N), canaliculos extracelulares (CLE) e canaliculos intracelulares (CLI). **C.** Secção histológica evidenciando a placa clivada (PC) e os canaliculos extracelulares (CLE).



**Figura 7.** Micrografias de luz da glândula metapleural de formigas submetidas ao teste de mercúrio-bromofenol, para detecção de proteínas. **A.** Células secretora de *Atta sexdens* com reação fortemente positiva. **B.** Célula secretora de *Pachycondyla crassinoda* com reação fortemente positiva. **C.** Células secretoras de *Paraponera clavata* mostrando células secretoras com reação fortemente positiva, com núcleo (N) evidente.



**Figura 8.** Micrografias de luz da glândula metapleural de formigas submetidas ao teste de PAS, para detecção de glicoproteínas e carboidratos neutros. **A.** Células secretora de *Atta sexdens* com reação fortemente positiva, evidenciando um núcleo (N) sem coloração. **B.** Célula secretora de *Pachycondyla crassinoda* com reação positiva fraca nas células, e nos canalículos intracelulares e extracelulares (CLI e CLE). **C.** Células secretoras de *Paraponera clavata* mostrando células secretoras com reação fracamente positiva, com núcleo (N) e canalículo intracelular (CLI) evidente.



**Figura 9.** Micrografias de luz da glândula metapleural de formigas submetidas ao teste de Azul de Nilo, para detecção de lipídios ácidos e neutros. **A.** Células secretora de *Atta sexdens* com reação fracamente positiva, evidenciando o núcleo (N). **B.** Célula secretora de *Pachycondyla crassinoda* com reação fracamente positiva nas células, sendo mais evidente nos canaliculos intracelulares (CLI). **C.** Células secretoras de *Paraponera clavata* mostrando células secretoras com reação positiva fraca, com núcleo (N) evidente.

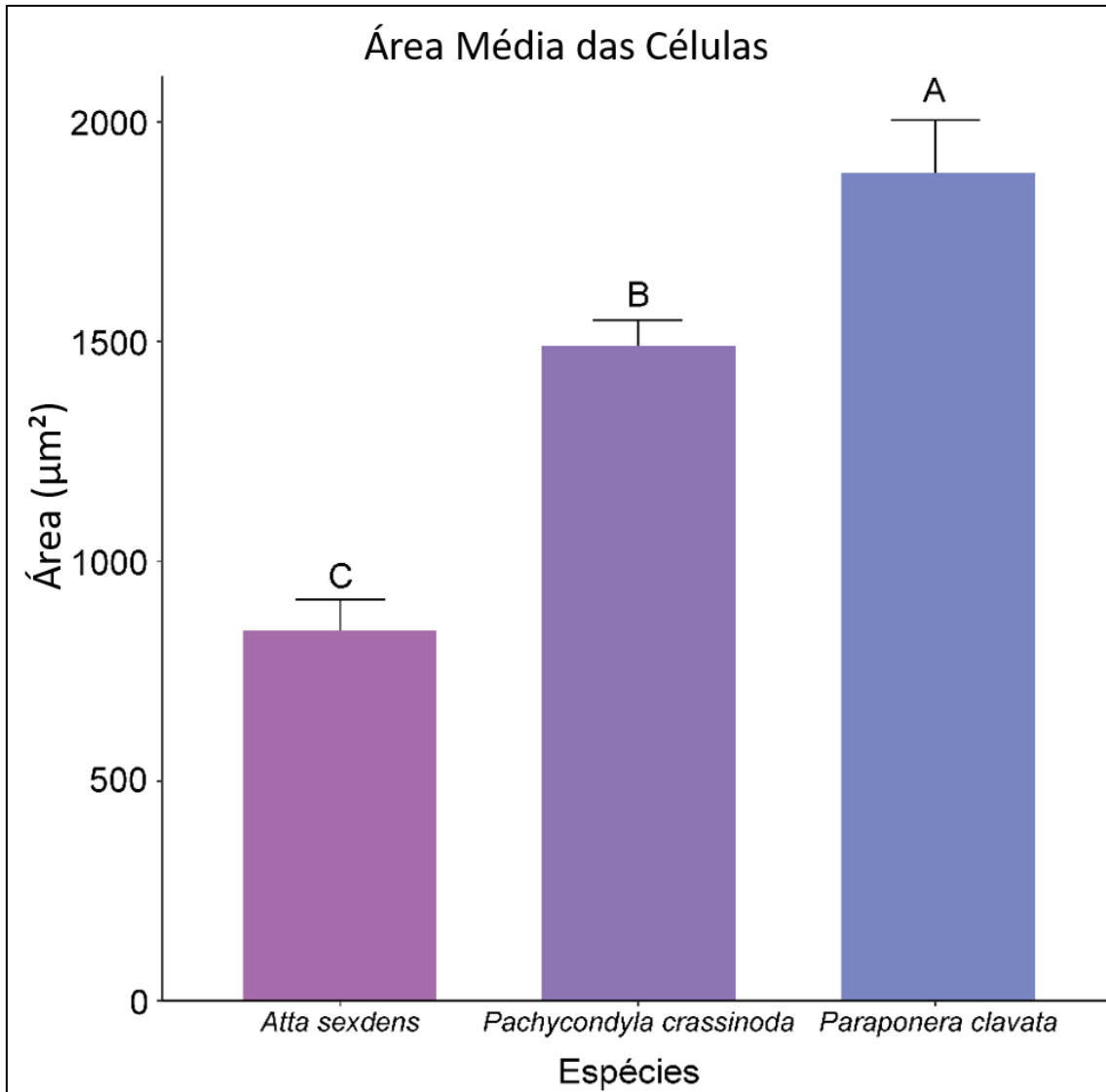
### 3.4. Morfometria das glândulas metapleurais

O número de células secretoras por glândula metapleural foi maior em, *P. clavata* com 315 células, seguida de *P. crassinoda* com 250 e *A. sexdens* com 169 (Tabela 1), demonstrando que a quantidade de células segue o tamanho corpóreo destes indivíduos. A área das células secretoras das glândulas metapleurais seguiu o padrão do tamanho das espécies, sendo maior em *P. clavata*, seguida de *P. crassinoda*, e *A. sexdens* ( $p < 0,05$ ; Fig. 10).

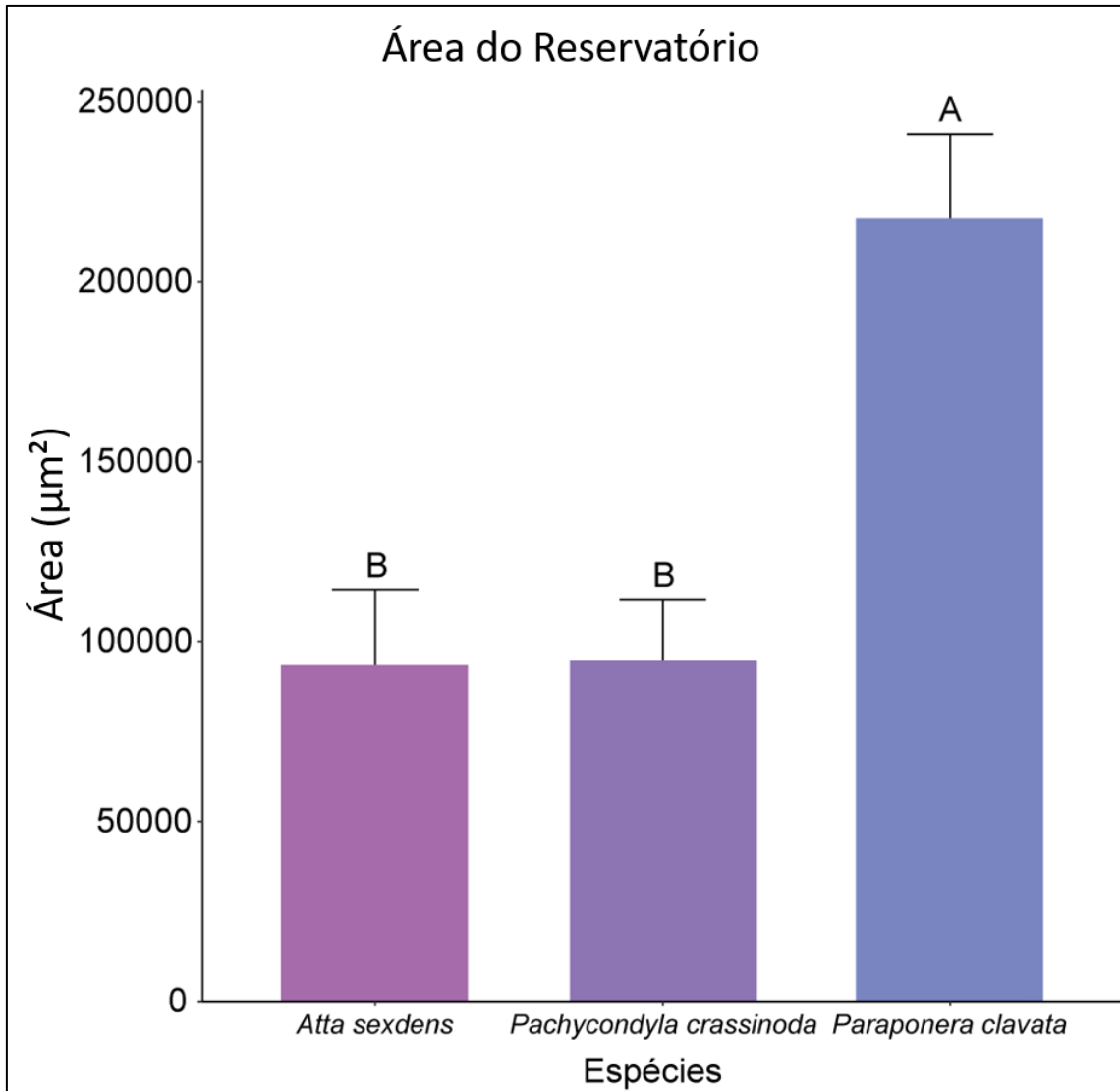
Em relação à área do núcleo das células secretoras da glândula metapleural, *P. clavata* apresentou maior valor ( $208.45 \mu\text{m}^2$ ), seguido de *A. sexdens* ( $165.68 \mu\text{m}^2$ ) e *P. crassinoda* ( $153.81 \mu\text{m}^2$ ) (Tabela 1). A relação núcleo/citoplasma das células secretoras mostrou que as células da glândula metapleural em *A. sexdens* tem alta atividade metabólica (0.20), seguida de *P. clavata* (0,11) e *P. crassinoda* (0.10) (Tabela 1).

A área do reservatório da glândula metapleural foi similar entre *P. crassinoda* e *A. sexdens* ( $p > 0,05$ ), sendo ambas menores que aquela de *P. clavata* ( $p < 0,05$ ; Fig. 11).

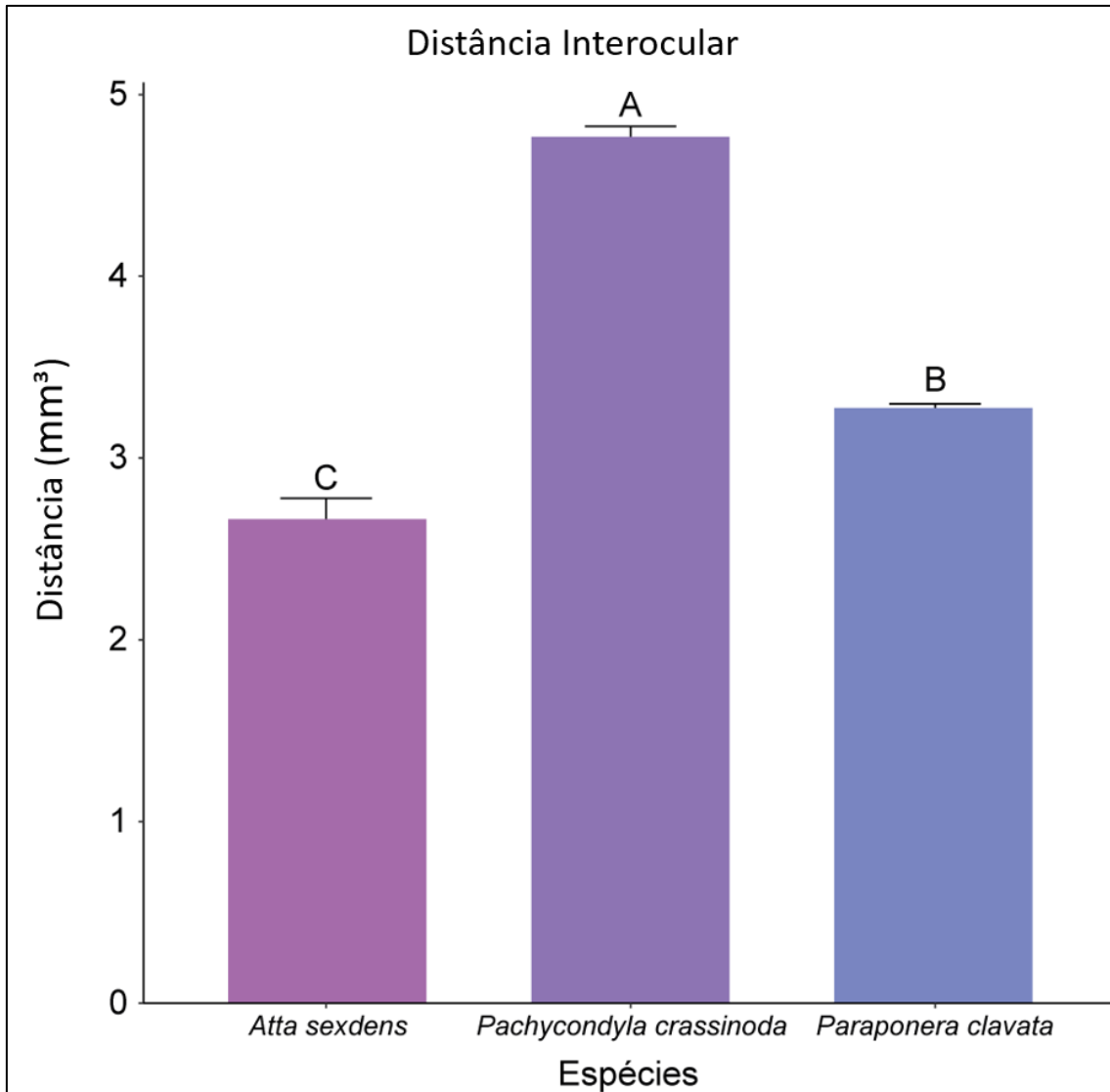
Em relação à distância interocular, *P. crassinoda* apresentou maior valor que *P. clavata* ( $p < 0,05$ ), e *A. sexdens* ( $p < 0,05$ ) respectivamente (Fig. 12). O teste de Spearman para análise da área das células secretoras da glândula metapleural e a distância interocular entre *A. sexdens*, *P. crassinoda* e *P. clavata*, revelou que não há correlação entre estas variáveis nas três espécies ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, o tamanho proporcional das células secretoras, obtido pela divisão da área celular pela distância interocular, mostrou que *P. clavata* apresentou maior valor, seguido de *A. sexdens* e maiores que aquele de *P. crassinoda* (Tabela 1). A proporção da área do reservatório foi maior em *P. crassinoda*, seguida de *P. clavata* e *A. sexdens* (Tabela 1).



**Figura 10.** Área média das células secretoras da glândula metapleurais de *Atta sexdens*, *Pachycondyla crassinoda* e *Paraponera clavata*. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença pelo teste do Bonferroni ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11.** Área do reservatório da glândula metapleural de *Atta sexdens*, *Pachycondyla crassinoda* e *Paraponera clavata*. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença pelo teste do Bonferroni ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12.** Distância interocular de *Atta sexdens*, *Pachycondyla crassinoda* e *Paraponera clavata*. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença pelo teste do Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1.** Dados morfométricos das glândulas metapleurais nas três espécies de formigas.

Espécies	Nº de células	Área do núcleo (média ± EP, $\mu\text{m}^2$ )	AC/D (média ± EP) <sup>a</sup>	AR/D x 10 <sup>6</sup> (média ± EP) <sup>b</sup>	RNC <sup>c</sup>
<i>A. sexdens</i>	169,9	165.68 ± 30.35	321.89 ± 101.81	36 ± 3	0.205
<i>P. crassinoda</i>	250,2	153.81 ± 23.12	312.86 ± 38.62	200 ± 11	0.105
<i>P. clavata</i>	315,8	208.45 ± 37.50	575.33 ± 107.99	66 ± 20	0.112

<sup>a</sup> Relação entre a área celular e distância interocular. <sup>b</sup> Relação entre a área reservatório e a distância interocular. <sup>c</sup> Relação núcleo-citoplasma. <sup>c</sup> Relação núcleo/citoplasma.

### 3.5. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A análise dos componentes químicos da glândula metapleurar revelou a presença de 33 compostos em *P. crassinoda* (Tabela 2) e 64 em *P. clavata* (Tabela 3). Destes, 22 foram compartilhados entre as duas espécies. Os grupos funcionais encontrados são representados principalmente por hidrocarbonetos alcanos (ramificados, não ramificados e cíclicos), álcoois (insaturados e saturados), derivados de ácidos benzoicos, derivados de ácidos sulfurosos e haletos orgânicos (Tabelas 2, 3).

Os compostos compartilhados entre as espécies mais abundantes foram n-Nonadecano, n-Eicosano, n-Heneicosano, Pentadecano 8-Hexilo, n-Docosano, n-Tetracosano, n-Nonacosano, n-Triacontano, Esqualeno, n-Dotriacontano, n-Tritriacontano, n-Tetratriacontano, n-Pentatriacontano, n-Hexatriacontano, n-Tetracontano, n-Tetratetracontano, n-Tetrapentacontano, Heptadecano 9-octil-, Heneicosano 11-(1-ethylpropil), Eicosano 7-Hexilo, Nonadecano 9-metil e Tetracosano 11-decil- (Tabelas 2, 3)

Os compostos encontrados em maior quantidade apenas em *P. clavata* foram Heptadecano 9-hexil-, n-Octacosano, Decano, Heptano, 4,4-dimetol, 13-Docosen-1-ol, (Z)- e n-Docosanol (Tabela 2), enquanto para *P. crassinoda* foram n-Pentacosano, Octacosano 2-metol, Hexadecano 5-butil e Octacosano (Tabela 3).

**Tabela 2.** Composição química da secreção da glândula metapleural de operárias forrageiras de *Pachycondyla crassinoda* (n=3). (Compostos com \* estão presentes nas duas espécies).

Compostos	TR	%A	Grupo funcional	Tamanho da cadeia	Fórmulas
n-heptadecano	12.769	2.69	Alcano	Cadeia longa	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>
n-Nonadecano *	17.037	2.16	Alcano	Cadeia longa	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>
Eicosane	15.748	2.30	Alcano	Cadeia longa	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>
n-Eicosano *	15.958	1.71	Alcano	Cadeia longa	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>
Hexadecano, 2,6,10,14-tetrametil	14.851	4.02	Alcano ramificado	Cadeia longa	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>
n-Heneicosano *	16.501	5.70	Alcano	Cadeia longa	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>
Pentadecano, 8-hexilo *	16.262	3.97	Alcano ramificado	Cadeia longa	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>
n-Docosano *	17.471	7.47	Alcano	Cadeia longa	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>
n-Tetracosano *	18.170	12.28	Alcano	Cadeia longa	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>
n-Pentacosano	22.339	16.99	Alcano	Cadeia longa	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>
n-Nonacosano *	18.970	9.54	Alcano	Cadeia longa	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>
Octacosano, 2-metil	21.407	12.57	Alcano ramificado	Cadeia longa	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>
n-triacontano *	19.908	10.09	Alcano	Cadeia longa	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>
n-esqualano	19.517	1.28	Alcano ramificado	Cadeia longa	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>
Esqualeno *	19.367	1.03	Alcano ramificado	Cadeia longa	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>
n-Dotriacontano *	20.233	8.46	Alcano	Cadeia longa	C <sub>32</sub> H <sub>66</sub>
n-Tritriacontano *	21.017	9.53	Alcano	Cadeia longa	C <sub>33</sub> H <sub>68</sub>
n-tetratriacontano *	21.387	6.40	Alcano	Cadeia longa	C <sub>34</sub> H <sub>70</sub>
n-Pentatriacontano *	22.770	8.46	Alcano	Cadeia longa	C <sub>35</sub> H <sub>72</sub>
n-hexatriacontano *	24.435	6.19	Alcano	Cadeia longa	C <sub>36</sub> H <sub>74</sub>
n-Tetracontano *	25.856	4.46	Alcano	Cadeia longa	C <sub>40</sub> H <sub>82</sub>
n-Tetratetracontano *	28.192	2.77	Alcano	Cadeia longa	C <sub>44</sub> H <sub>90</sub>
n-Tetrapentcontano *	31.044	1.38	Alcano	Cadeia longa	C <sub>54</sub> H <sub>110</sub>
Octadecano, 1-iodo-	26.453	1.29	Haletos orgânicos		C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> I
L-Prolinamida, 5-oxo-L-prolil-L-fenilalanil-4-hidroxi-	13.002	1.01	Função Amida		C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
Decano, 1-iodo-	13.064	1.33	Haletos orgânicos		C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> I
Nonadecano, 9-metil *	17.514	4.91	Alcanos ramificado	Cadeia longa	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>
Hexadecano, 5-butilo	18.008	10.05	Alcanos ramificado	Cadeia longa	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>
Heptadecano, 9-octil *	18.536	13.22	Alcanos ramificado	Cadeia longa	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>
Heneicosano, 11-(1-etilpropil) *	19.117	16.92	Alcanos ramificado	Cadeia longa	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>

Eicosano, 7-hexilo *	19.772	14.77	Alcanos ramificado	Cadeia longa	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>
octacosano	20.522	13.25	Alcanos	Cadeia longa	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>
Tetracosano, 11-decil- *	22.454	8.15	Alcanos ramificado	Cadeia longa	C <sub>34</sub> H <sub>70</sub>

**Tabela 3.** Composição química da secreção da glândula metapleurar de forrageiras de *Paraponera clavata*, (n=5), (Compostos com \* estão presentes nas duas espécies).

Compostos	TR	%A	Grupo funcional	Tamanho da cadeia	Fórmulas
n-Nonadecano *	17.044	7.17	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>
n-Eicosano *	15.749	1.46	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>
n-Docosano	9.56	9,56	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>
n-Heneicosano *	16.837	7.12	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>
Pentadecano 8-Hexil *	16.279	3.62	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>
n-Docosano *	17.454	8.27	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>
n-Tetracosano *	18.146	9.99	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>
n-Nonacosano *	18.950	12.22	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>
Nonacosane	18.942	1.80	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>
n-triacontano *	19.883	12.46	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>
Esqualeno *	19.363	1.97	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>
n-Dotriacontano *	19.874	6.58	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>32</sub> H <sub>66</sub>
n-Tritriacontano *	21.009	10.73	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>33</sub> H <sub>68</sub>
n-tetratriacontano *	20.979	10.92	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>34</sub> H <sub>70</sub>
n-Pentatriacontano *	22.300	9.73	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>35</sub> H <sub>72</sub>
n-hexatriacontano *	23.924	7.27	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>36</sub> H <sub>74</sub>
n-Tetracontano *	25.825	1.34	Alcano	Cadeia Longa	C <sub>40</sub> H <sub>82</sub>

			saturado		
n-tetratetracontano	25.825	4.00	Alcano saturado		
n-tritetracontano	25.851	4.82	Alcano saturado		
n-Tetratetracontano *	28.189	2.44	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>44</sub> H <sub>90</sub>
n-Tetrapentcontano *	31.040	1.12	Alcano saturado	Cadeia Longa	C <sub>54</sub> H <sub>110</sub>
Tetrapentcontano, 1,54-dibromo-	25.087	0.96	Haletos orgânicos		C <sub>54</sub> H <sub>108</sub> Br <sub>2</sub>
n-Docosanol	22.063	13.50	Álcoois		C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O
n-Tetracosanol	23.607	2.41	Álcoois		C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O
13-Docosen-1-ol, (Z)-	25.086	22.69	Álcoois insaturado		C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O
(Z)-14-Tricosenil formato	25.208	4.15	Formate		C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>
n-heptacosanol	25.475	5.09	Álcoois		C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> O
Hexano, 2,3,4-trimetil-	5.342	1.85	Alcanos ramificado	Cadeia média	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>
Heptano, 4,4-dimetil	5.713	8.71	Alcanos ramificado	Cadeia média	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>
3-Etil-3-metilheptano	8.036	0.92	Alcanos ramificado	Cadeia média	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>
Ácido benzóico, 4-etoxi-, éster etílico	11.480	4.40	Derivado de ácido benzoico		C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>
Palmitato de isopropila	14.348	1.74	Derivado de ácido carboxílico		C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>
(2,3-difenilciclopropil)metil fenil sulfóxido, trans-	16.929	1.42	Sulfóxido		C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> OS
Octocrileno	18.269	1.72	Derivado de ácido carboxílico, com nitrogênio		C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>2</sub>
Ciclohexano, propil-	7.385	3.97	Alcano ciclíco		C <sub>9</sub> H <sub>18</sub>
Octano 2,6-Dimetil	7.434	5.56	Alcano	Cadeia média	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>
Heptano, 3-etil-2-metil-	7.533	2.72	Alcano ramificado	Cadeia média	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>
Ciclohexano, 1,1,2,3-tetrametil-	7.740	5.31	Alcano ciclíco		C <sub>10</sub> H <sub>20</sub>
Ciclohexano, 1-metil-2-propil-	8.091	5.97	Alcano ciclíco		C <sub>10</sub> H <sub>20</sub>
1H-Indeno, octahidro-, cis-	8.169	2.69	Alcanos ciclíco, compostos quiral		C <sub>9</sub> H <sub>16</sub>
Decano	8.268	11.89	Alcano	Cadeia média	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>
Decano, 4-metil-	8.525	3.71	Alcano	Cadeia média	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>

			ramificado		
Ciclohexano, 4-butil-	8.667	3.06	Alcano ramificado	Cadeia média	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub>
Undecano	9.334	6.79	Alcano	Cadeia média	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>
1-Metildecahidronaftaleno	9.702	1.31	Alcano ciclíco	Cadeia média	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub>
Dodecano	10.254	1.26	Alcanos	Cadeia média	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>
Ácido sulfuroso, éster hexil octil	12.543	1.99	Derivado de Ácido sulfuroso		C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> S
Undecano, 2,4-dimetil-	12.847	2.13	Alcano ramificado	Cadeia média	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>
2,3-dimetildodecano	13.949	1.82	Alcano ramificado	Cadeia média	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>
Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster bis(2-metilpropil)	14.938	1.40	Derivado de ácido benzoico		C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>
Nonadecano, 2-metil	17.525	2.27	Alcano	Cadeia média	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>
Heptadecano, 9-hexil-	18.014	10.42	Alcano ramificado	Cadeia média	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>
Heptadecano, 9-octil- *	18.541	9.39	Alcano ramificado	Cadeia média	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>
Heneicosano, 11-(1-etilpropil) *	19.120	9.40	Alcano ramificado	Cadeia média	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>
Eicosano, 7-hexilo *	19.774	8.24	Alcano ramificado	Cadeia média	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>
n-Octacosano	20.525	7.77	Alcano	Cadeia longa	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>
Octano, 4,5-dietil-	9.351	1.28	Alcano ramificado	cadeia media	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>
Nonano, 4-etil-5-metil-	9.521	2.05	Alcano ramificado	cadeia media	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>
Decano, 5,6-dimetil-	9.681	2.14	Alcano ramificado	cadeia media	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>
n-Octadecano	16.569	2.85	Alcano	Cadeia Longa	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>
Nonadecano, 9-metil *	17.520	9.12	Alcano ramificado	Cadeia Longa	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>
Octacosano, 2-metil	21.409	5.67	Alcano ramificado	Cadeia Longa	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>
Tetracosano, 11-decil- *	22.455	5.28	Alcano ramificado	Cadeia Longa	C <sub>34</sub> H <sub>70</sub>
Ácido sulfuroso, éster hexil pentadecílico	23.699	3.18	Derivado de Ácido sulfuroso		C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub> S

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Morfologia

A anatomia da glândula metapleurar de *P. clavata* e *P. crassinoda* com grupos de células secretoras que liberam a secreção através de células canais, que é armazenada em um reservatório, sendo liberadas para o exterior por meio de um orifício de abertura é semelhante àquela descrita para outras formigas, incluindo as Myrmicinae *Myrmecia nigrocincta* (Tulloch et al. 1962), *A. sexdens* (Hölldobler e Engel-Siegel 1984; Gusmão et al., 2001), *Crematogaster clariventris*, *Crematogaster depressa* (Fanfani e Giovannotti, 1994), *Myrmecia gulosa*, *Myrmecia urens* (Angus et al., 1993), *Acromyrmex octospinosus* (Bot et al., 2001), *Atta bisphaerica*, *Atta capiguara*, *Acromyrmex subterraneus* (Souza et al., 2006), *Acromyrmex coronatus*, *Atta laevigata*, *Apterostigma pilosum*, *Mycetarotes parallelus*, *Pogonomyrmex naegeli*, *Wasmannia auropunctata* (Vieira et al., 2012a), *Acromyrmex laticeps* (Junqueira e Diehl 2014), Ectatomminae *Ectatomma brunneum* e Dolichoderinae *Technomyrmex vitiensis* (Pech e Billen 2017) e a Paraponerinae *P. clavata* (Martins et al., 2022) demonstrando ser um padrão entre as formigas. A localização da abertura no metatórax facilita a distribuição da secreção pelo corpo da formiga com o auxílio das pernas traseiras, como descrito para outras subfamílias de formigas (Billen et al., 2011).

As diferenças encontradas em relação ao tamanho, cor e formato da glândula metapleurar e da sua abertura externa entre *P. clavata* e *P. crassinoda*, possivelmente estão associados ao estilo de vida destes indivíduos, além do tipo de microrganismos aos quais são expostos dentro e fora do ninho, sendo que *P. crassinoda* nidifica em árvores que tenham partes danificadas ou troncos podres e forrageia na serapilheira das florestas no qual habitam, e são predadoras oportunistas (Mackay e Mackay, 2010). Já *P. clavata*, possui ninhos subterrâneos na base de árvores, forrageando em diferentes níveis dos dosséis de árvores, alimentando-se de néctar extrafloral e presas vivas (Dilsinne et al., 2019). Uma alternativa

para explicar as diferenças anatômicas em relação a glândula metapleurais entre as espécies estudadas, podem ser as vias evolutivas do desenvolvimento das mesmas, pois a habilidade de produzir e secretar compostos por estes indivíduos fornece uma capacidade adaptativa aos desafios impostos pelos seus habitats (Brückner e Parker, 2020), sendo possível que as glândulas metapleurais possam surgir e diversificar mesmo no nível da espécie (Ulmer et al., 2023). Atrelado a este fato, soma-se a recente descoberta de um homólogo da glândula metapleurais em uma vespa parasitoide (*P. polyturator*), com características similares em relação à localização, estrutura e orifício de saída àquelas encontradas nas formigas (Ulmer et al., 2023). Estes dados indicam que a glândula metapleurais possui anatomia semelhante em todos os indivíduos, com apenas algumas diferenças que podem ser atreladas ao estilo de vida dos mesmos.

As características histológicas da glândula metapleurais encontradas nas três espécies aqui estudadas são semelhantes ao encontrado em outras formigas como *E. brunneum*, *A. coronatus*, *A. laevigata*, *A. pilosum*, *M. parallelus*, *P. naegeli*, *W. auropunctata* (Vieira et al., 2012a), rainhas de *A. sexdens* e *Atta vollenweideri* (Vieira et al., 2015), algumas espécies de *Strumigenys* (Myrmicinae) (Wang et al., 2023) e para *P. clavata* (Martins et al., 2022), sendo portanto encontradas em pares, com uma camada de células secretoras interligadas ao reservatório por meio de ductos secretores, compreendendo as células da classe III, segundo a classificação de Noirot e Quenedey (1974), que consiste em unidades bicelulares constituídas por uma célula secretora e uma célula ducto que conduz a secreção para o reservatório. Estes resultados indicam que esta glândula possui uma organização estrutural conservada nas formigas, suportando a sua sinapomorfia para o grupo.

Em relação ao formato da glândula metapleurais, *A. sexdens* apresenta uma glândula alongada com células alongadas e núcleos esféricos, sendo semelhante ao observado em rainhas de *A. sexdens* e *A. vollenweideri* (Myrmicinae) (Vieira et al., 2015). A glândula de *P.*

*clavata* possui formato de couve-flor com células e núcleos esféricos, sendo semelhante ao descrito por Martins et al. (2022) para *P. clavata*. Para *P. crassinoda* a glândula metapleurale com formato de dois cachos não tem sido relatada para outras espécies estudadas. A diferença observada em relação ao formato da glândula entre as três espécies aqui analisadas demonstra que apesar de serem constituídas por uma camada de células secretoras com canaliculos interligados ao reservatório, seu formato provavelmente pode ser associado ao estilo de vida dos espécimes. Outra hipótese, seria a ocorrência de variações associadas à filogenia, porém *P. crassinoda* e *P. clavata* pertencem aos grupos-irmãos Ponerinae e Paraponerinae, respectivamente (Fernandez et al., 2021).

Em relação ao reservatório, as três espécies analisadas neste estudo, apresentam apenas uma câmara, porém Vieira et al. (2015) observou reservatórios com duas câmaras em rainhas de *A. sexdens* e *A. vollenweideri*, demonstrando que possivelmente a glândula metapleurale de rainhas é morfologicamente diferente das operárias (Vieira et al., 2012a; Vieira et al., 2015; Martins et al., 2022; Wang et al., 2023).

*Atta sexdens* e *P. clavata* apresentam as células secretoras liberando a secreção no reservatório através de canaliculos formando sete placas crivadas, similar ao descrito para *P. clavata* (Martins et al., 2022), porém Vieira et al. (2015) observou que em rainhas de *A. sexdens* ocorrem 20 placas crivadas, indicando que esta glândula em rainhas é maior, o que pode ser devido ao fato que rainhas utilizam mais esta glândula que suas operárias. *Pachycondyla crassinoda* apresenta uma única placa crivada, sendo semelhantes ao relatado para *E. brunneum* e *W. auropunctata* (Vieira et al., 2012a). Este resultado demonstra que a quantidade de placas crivadas provavelmente surgiu independentemente ao longo da evolução destes insetos, pois, *P. crassinoda* nidifica em árvores danificadas ou troncos podres, forrageando na serapilheira das florestas e são predadoras oportunistas (Mackay e Mackay, 2010), *E. brunneum* nidifica em árvores e se alimenta de nectário extraflorais (Passos e Leal,

2019), enquanto *W. auropunctata* nidifica em diversos lugares e possui hábitos alimentares generalistas (Rosumek, 2017). Em relação a filogenia dessas espécies, *E. brunneum* pertence a Ectatomminae, que é grupo-irmão de Myrmicinae, no qual *W. auropunctata* está incluída, e *P. crassinoda* pertence a Ponerinae que está distante na filogenia das demais (Fernández et al., 2021). Novas pesquisas precisam ser realizadas em relação à quantidade de placas em outras espécies para ampliar o conhecimento sobre estas características nas formigas.

Os resultados histoquímicos para a detecção de proteínas totais, glicoproteínas, carboidratos e lipídeos nas glândulas metapleurais de *A. sexdens*, *P. crassinoda* e *P. clavata* demonstram semelhança com os observados em rainhas de *A. sexdens* (Vieira et al. 2015) com a presença de polissacarídeos, proteínas e lipídeos. A reação para proteínas revela intensa produção nas três espécies, o que pode estar atrelado à resposta imune em insetos, pois peptídeos são efetores importantes de amplo espectro de atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária nos insetos (Staczek et al., 2023).

O número de células secretoras nas glândulas metapleurais de *P. clavata* (315) e *P. crassinoda* (250) é superior aos descritos para outras espécies como, *E. brunneum* (47), *P. naegeli* (30), *W. auropunctata* (15), *A. pilosum* (42), *M. parallelus* (30), *Trachymyrmex fuscus* (60) (Vieira et al., 2012a). As operárias de *A. sexdens* analisadas possuem 169 células, porém Vieira et al. (2015) relatam que rainhas de *A. sexdens* e *A. vollenweideri* possuem 528 e 451 células secretoras, respectivamente, o que pode ser devido a casta analisada. Em espécies de *Strumigenys*, rainhas apresentam glândulas metapleurais com mais células que as operárias (Wang et al., 2023). Estudos que visam observar se este padrão onde rainhas possuem mais células secretoras na glândula metapleural que suas operárias precisam ser realizadas em mais representantes de formigas, para a verificação deste padrão.

Apesar de *P. clavata* apresentar a maior área nuclear das células secretoras da glândula metapleural, as análises estatísticas constataam que ela não possui a maior taxa de

atividade metabólica quando comparada com as demais espécies deste estudo, considerando a sua menor relação núcleo/citoplasma. Neste sentido, *A. sexdens* possui a maior atividade metabólica, o que pode ser devido ao estilo de vida da espécie, no qual o ninho ou o jardim de fungos são expostos a diversos patógenos e sua principal fonte de combate a estes microrganismos é a glândula metapleurais (Vieira et al., 2012b; Vieira et al., 2015). Poulsen et al. (2002) propõem que a produção dos compostos antimicrobianos é energeticamente custosa, ou seja, algumas espécies gastam mais recursos provenientes da secreção da glândula metapleurais, pois esta seria seu principal meio de combate a patógenos, enquanto em outras espécies que não gastam tantos recursos, outras glândulas exócrinas atuam em conjunto para a mesma finalidade. Aili et al. (2020) identificaram que *P. clavata* expressa proteínas com propriedades antibacterianas na glândula de veneno, indicando que ela também atua no combate a microrganismos. Provavelmente *P. clavata* utiliza tanto a glândula de veneno quanto a glândula metapleurais para o combate a patógenos, o que poderia explicar a sua taxa metabólica ser menor que as demais espécies.

O tamanho do reservatório é semelhante em *P. crassinoda* e *A. sexdens*, apesar de na primeira espécie ser maior que na segunda. O tamanho médio do reservatório é uma indicação da capacidade secretora (Martins et al. 2022, Azevedo et al. 2007, Vieira et al. 2012a). Possivelmente estas espécies secretam uma quantidade semelhante de compostos contra patógenos, porém novos estudos devem ser realizados para avaliar a capacidade de secreção das glândulas metapleurais nestas espécies.

Os resultados indicam que não há correlação entre a distância interocular e a área das células secretoras da glândula metapleurais, apesar da área celular ser maior em *P. clavata* e menor em *A. sexdens*, similar ao reportado em diferentes espécies de *Atta* (Vieira et al. 2015). Assim, o presente estudo revela que possivelmente a área das células secretoras da glândula

metapleurais está associada a outro fator além do tamanho do indivíduo, e necessita de novas pesquisas para ser elucidada esta questão.

A relação entre a glândula metapleurais e a distância interocular, mostra que *A. sexdens* possui as maiores células secretoras; provavelmente este fato está associado à sua alta taxa de atividade metabólica (Azevedo et al., 2007; Vieira et al., 2012a). Por outro lado, a relação da área do reservatório e a distância interocular, evidencia que *P. crassinoda* tem maior reservatório, indicando que esta espécie tem uma capacidade secretora maior que as demais. As três espécies analisadas neste estudo diferem significativamente, provavelmente são afetadas por patógenos em grau variado, o que explicaria estas diferenças.

#### **4.2. Volatilômica**

Os tempos de retenção dos compostos produzidos pelas glândulas metapleurais de *P. clavata* e *P. crassinoda* são semelhantes, mas ocorrem diferenças em relação à porcentagem da massa dos mesmos compostos entre as duas espécies, com destaque para compostos que atuam na defesa imune, incluindo Dodecano, n-Heptadecano, n-Nonadecano, n-Pentacosano (Zorzetto et al., 2015), n-Heneicosano (Vanitha et al., 2020) e n-Docosanol (Abreva, 2023).

Os resultados mostram maior quantidade de compostos na glândula metapleurais de *P. clavata* (64) e em *P. crassinoda* (33) que em outras formigas, incluindo *A. laevigata* (12), *A. coronatus*, *E. brunneum* e *Pogonomyrmex neagelii* (9), *T. fuscus* (10) e *A. pilosum* (4) (Vieira et al. 2012b) e na vespa parasitoide *P. polyturator* (7) (Ulmer et al. 2023). Novos estudos precisam ser feitos com o intuito de investigar a quantidade expressiva de compostos químicos presentes em *P. clavata* e *P. crassinoda*, a fim de elucidar o comportamento da glândula metapleurais destas espécies.

Dos 87 compostos identificados nas glândulas metapleurais, apenas 22 são compartilhados por de *P. clavata* e *P. crassinoda*, demonstrando que a composição química das secreções glandulares pode ser espécie-específica (Blum e Hermann, 1978). Em relação a

quantidade de compostos antimicrobianos, foram identificados nove em *P. clavata* e seis em *P. crassinoda*. Em relação aos grupos funcionais encontrados, é comum a presença de compostos com diferentes atividades biológicas, contendo principalmente hidrocarbonetos, ácidos graxos livres, triacilglicerídeos, álcoois, ceras, ésteres etílicos, proteínas e esteróis (Marciniak et al., 2011; Vieira et al., 2012b; Buszewska-Forajta et al., 2014; Ulmer et al., 2023), além de peptídeos com potencial atividade antifúngica e antibacteriana (Olusola et al., 2003; Golebiowski et al., 2011).

O n-Nonadecano encontrado em *P. clavata* e *P. crassinoda* é um dos composto mais abundante na glândula de Dufour em Myrmicinae (Evershed e Morgan, 1981), incluindo *Messor minor* e *Messor capitatus* (Tullio et al., 2003), *Solenopsis invicta*, *Solenopsis richteri*, *Solenopsis germinata* e *Solenopsis xyloni* (Barlin et al., 1976), em Ectatomminae *Ectatomma* spp. (Morgan, 2003), em Formicinae *Cataglyphis* spp. (Dahbi et al., 2008), *Formica* spp. (Bergström e Löfqvist, 1973), *Polyerges* spp. (D'Etorre et al., 2000), *Paratrechina* spp. (Witte et al., 2007) e em Ponerinae *Diacamma* spp. (Morgan et al., 2003). O mesmo composto foi encontrado na glândula mandibular de *Pachycondyla indica* e *Pachycondyla striata* (Morgan et al., 1999). O n-Nonadecano foi encontrado no homólogo da glândula metapleurale da vespa parasitoide *P. polyturator* (Ulmer et al., 2023). Este composto, também ocorre como hidrocarboneto cuticular em Dolichoderinae (Scarparo et al., 2019) e no gênero *Pachycondyla* (Yusuf et al., 2010).

Os compostos n-Heneicosano, n-Tetracosano, e n-Docosano foram compartilhados entre *P. clavata* e *P. crassinoda*, sendo encontrados também na glândula metapleurale de *S. germinata* e *S. invicta* (Cabrera et al., 2004). n-Tetracosano também ocorre como hidrocarboneto cuticular em *Pogonomyrmex barbatus* (Sturgis et al. 2011) e *Camponotus vagus* (Meskali et al. 1995).

Os n-Nonacosano e n-Dotriacontano, que foram identificados nas duas espécies, e n-Octacosano apenas em *P. clavata*, foram relatados como hidrocarbonetos cuticulares na vespa *Polistes metricus* (Espelie et al. 1990).

O n-Tritriacontano compartilhado entre *P. clavata* e *P. crassinoda* foi relatado como hidrocarboneto cuticular em representantes Myrmicini (Guillem et al. 2016).

Os n-Tetratriacontano, n-Pentatriacontano e n-Hexatriacontano, compostos compartilhados entre *P. clavata* e *P. crassinoda*, foram caracterizados como hidrocarbonetos cuticulares nos Myrmicinae *Temnothorax unifasciatus* e *Temnothorax recedens* (Provost et al. 2008). Porém n-Hexatriacontano também foi encontrado na glândula intramandibular do Ponerinae *Neoponera villosa* (Martins et al., 2015).

O n-Eicosano presente na glândula metapleurale de *P. clavata* e *P. crassinoda*, e n-Octadecano apenas em *P. clavata* são relatados como hidrocarbonetos cuticulares em *E. brunneum* (Pereira et al., 2019). Dodecano presente apenas em *P. clavata* é relatado pela primeira vez em formigas, sendo encontrado em extratos da casca de planta medicinal nativa da Ásia *Symplocos crataegoides* (Govindarajan et al. 2016). Dodecano, n-Heptadecano, n-Nonadecano e n-Pentacosano foram identificados no extrato de três espécies de *Hypericum*, uma planta medicinal, com atividade antidepressiva, antinociceptiva e antimicrobiana (Zorzetto et al., 2015).

O n-Heneicosano presente na glândula metapleurale de *P. clavata* e *P. crassinoda* foi identificado com atividade antimicrobiana em *Plumbago zeylanica*, uma planta tradicional na medicina Indiana, usada na prevenção de inflamação, antimicrobiana entre outras funções (Vanitha et al., 2020).

O n-Docosanol, encontrado somente na glândula metapleurale de *P. clavata*, é o primeiro registro para uma espécie de formiga, sendo encontrado em muitos alimentos, como azeite de oliva, óleo de peixe, sementes de girassol, alface, cera de abelha e maçãs (Radler,

1965; Tulloch, 1976; Morrison, 1983; Frega et al., 1993), além de ser produzido endogenamente no corpo humano (Nicolaidis, 1967; Harvey et al., 1987; Harvey, 1989). Este composto possui atividade antiviral contra o vírus herpes simplex (HSV) (Abreva, 2023), e para vírus envelopados, incluindo citomegalovírus, vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus sincicial proteção (RSV), vírus influenza A e vírus murino da leucemia Friend (Katz et al., 1994; Marcelletti et al., 1996).

Outro composto identificado somente em *P. clavata* é 13-Docoseno-1-ol (Z)- foi identificado na epicutícula de operárias da abelha *Apis mellifera ligustica* (Naccarato et al., 2019). O Decano, encontrado apenas em *P. clavata*, foi identificado no extrato corpóreo de *Karria lacca* (Hemiptera: Kerriidae) que produz a resina adesiva lac com uso industrial e militar, devido às propriedades de adesão e isolamento (Mohanasundaram et al., 2022).

O Nonadecano 9-metil e esqualeno que são compartilhados pela glândula metapleurar de *P. clavata* e *P. crassinoda* são descritos como compostos de reconhecimento de companheiras em ninhos de *Pachycondyla analis* (Yusuf et al., 2010).

O Tetracosano, 11-decil compartilhado pelas duas formigas aqui analisadas, é encontrado na bactéria *Streptomyces sparsus* (Managamuri et al., 2017), sendo a primeira identificação em insetos.

Entre os compostos identificados somente em *P. crassinoda*, Octacosano 2-metil, foi encontrado em cupis *Zootermopsis* (Haverty et al., 1988) e *Coptotermes formosanus* (Haverty et al., 1990). Outro composto encontrado apenas em *P. crassinoda* é Hexadecano 5-butilo, relatado por como feromônio sexual em *Phyllophaga raveda* (Coleoptera: Melolonthinae) Romero-López et al. (2019).

O Heptadecano 9-hexil foi encontrado apenas em *P. clavata*, sendo o primeiro relato para insetos, sendo o principal composto no extrato da folha e raiz da erva medicinal com atividade antibacteriana, *Solanum khasianum* (Chirumamilla et al., 2022). O Pentadecano 8-

Hexyl identificado em *P. clavata* e *P. crassinoda*, foi reportado na glândula de veneno de *Vespa velutina*, como feromônio de alarme (Rodríguez-Flores et al. 2021).

Alguns compostos encontrados na glândula metapleurale das espécies aqui analisadas, apresentam porcentagem de massa alta, porém não há dados sobre a atividade biológica dos mesmos, incluindo Heptano, 4,4-dimetil (somente em *P. clavata*), Heptadecano 9-octil; Heneicosano, 11-(1 etilpropil) e Eicosano 7-hecilo (nas duas espécies), demonstrando a necessidade de estudos *in vivo* e *in vitro* para elucidar qual a função destes compostos nas espécies estudadas.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados aqui obtidos indicam que os aspectos morfológicos da glândula metapleural possuem algumas diferenças entre as três espécies estudadas, provavelmente pelo estilo de vida destes indivíduos, confirmando a hipótese I.

Os resultados mostram que o número de células e o tamanho do reservatório são maiores na espécie arborícola, *P. clavata*, e menor em *P. crassinoda* e *A. sexdens* com hábitos terrestres, rejeitando a hipótese II. Apesar de *A. sexdens* possuir menor número de células, área celular e reservatório, a glândula apresenta alta taxa de atividade metabólica, enquanto *P. crassinoda* possui um número de células maior que *A. sexdens*, e apresenta menor atividade metabólica, mas possui a mesma capacidade de secreção de substâncias.

Os compostos químicos identificados nas duas espécies comprovam a natureza antimicrobiana da secreção da glândula metapleural, além de demonstrar que a espécie arborícola, *P. clavata* apresenta maior quantidade de compostos químicos em relação a *P. crassinoda*, com hábitos terrestres, confirmando a hipótese III. Alguns compostos são o primeiro registro para as formigas, ou para os insetos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreva. (2023). Docosanol Cream. Web MDRx, Available at: <https://www.rxlist.com/abreva-drug.htm#description> (Accessed July, 2023).
- Aili, S. R., Touchard, A., Hayward, R., Robinson, S. D., Pineda, S. S., Lalagüe, H., Mrinalini, Vetter, I., Undheim, E. A. B., Kini, R. M., Escoubas, P., Padula, M. P., Myers, G. S. A., Nicholson, G. M. An Integrated Proteomic and Transcriptomic Analysis Reveals the Venom Complexity of the Bullet Ant *Paraponera clavata*. *Toxins*, 12(5), 324. 2020.
- Antweb. Bolton World Catalog. <https://www.antweb.org/>. (Access date: July, 11, 2023).
- Angus, C. J., Jones, M. K., Beattie, A. J. A possible explanation for size differences in the metapleural glands of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Aust. J. Entomol.* 32, 73–77p, 1993.
- Attygalle, A.B., Siegel, B., Vostrowsky, O., Bestmann, H.J., Maschwitz, U. Chemical composition and function of metapleural gland secretion of the ant, *Crematogaster deformis* smith (Hymenoptera: Myrmicinae). *Journal of Chemical Ecology*, 15: 317-328p, 1989.
- Azevedo. D. O., Teixeira, E. W., Alves, M.L. T., Moreti, A. C. C., Blochtein, B., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E. Comparative analyses of the abdominal tergal glands in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) queens. *Anim Biol* 57: 329-338p, 2007.
- Bacarro, F. B., Feitosa, R. M., Fernandez, F., Fernandes, I. O., Izzo, T. J., Souza, J. L. P. e Solar, R. Guia para os gêneros de formigas do Brasil. Manaus: Editora INPA 388p. 2015.
- Barlin, M. R., Blum, M. S., Brand, M. M. Fire ant trail pheromones: Analysis of species specificity after gas chromatographic fractionation. *Journal of Insect Physiology*, 22(6): 839-844p, 1976.

- Beattie, A. J., Turnbull, C. L., Hough, T., Knox, R. B. Antibiotic production: a possible function for the metapleural glands of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Annls Entomol Soc Amer* 79:448-450p, 1986.
- Bergström, G., Löfqvist, J. Chemical congruence of the complex odoriferous secretions from Dufour's gland in three species of ants of the genus *Formica*. *J. Insect Physiol.* 19:877-907p, 1973.
- Billen, J., Morgan, E. D. Pheromone communication in social insects – sources and secretions. In R.K. Vander Meer, M.D. Breed, M.L. Winston & K.E. Espelie (Eds), *Pheromone Communication in Social Insects: Ants, Wasps, Bees and Termites* Boulder: Westview Press, 3-33p, 1998.
- Billen, J., Hashim, R., Ito, F. Functional morphology of the metapleural gland in workers of the ant *Crematogaster inflata* (Hymenoptera, Formicidae). *Invertebr Biol* 130(3): 277-281p, 2011.
- Billen, J., Sobotník, J. Insect exocrine glands. *Arthropod Structure & Development*, 44: 399-400p, 2015.
- Blum, M. S., Hermann, H. R. Venoms and venom apparatuses of the Formicidae: Dolichoderinae and Aneuretinae. *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*, 48: 871-894p, 1978.
- Bot, A. N. M., Obermayer, M. L., Hölldobler, B., Boomsma, J. J. Functional morphology of the metapleural gland in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Insect Soc.* 48, 63–66p, 2001.
- Bulova, S., Purce, K., Khodak, P., Sulger, E., O'Donnell, S. Into the black, and back: the ecology of brain investment in Neotropical army ants (Formicidae: Dorylinae). *Naturwissenschaften*, 103:31. 2016.

- Branstetter, M. G., Danforth, B. N., Pitts, J. P., Faircloth, B. C., Ward, P. S., Buffington, M. L., Gates, M. W., Kula, R. R., Brady, S. G. Phylogenomic Insights into the Evolution of Stinging Wasps and the Origins of Ants and Bees. *Current Biology*, 27 (7): 1019-1025p, 2017.
- Brown, W. L. Jr. An hypothesis concerning the function of the metapleural glands in ants. *Amer Nat* 102:188-191p, 1968.
- Brückner, A., Parker, J. Molecular evolution of gland cell types and chemical interactions in animals. *The Journal of Experimental Biology*, 223, 2020.
- Buszewska-Forajta, M., Siluk, D., Struck-Lewicka, W., Raczak-Gutknecht, J., Markuszewski, M. J., Kaliszan, R. Identification of lipid fraction constituents from grasshopper (*Chorthippus* spp.) abdominal secretion with potential activity in wound healing with the use of GC-MS/MS technique. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 89: 56– 66p, 2014.
- Cabrera, A., Williams, D., Hernández, J. V., Caetano, F. H., Jaffe, K. Metapleural- and Postpharyngeal-Gland Secretions from Workers of the Ants *Solenopsis invicta* and *S. geminata*. *Chemistry & Biodiversity*, 1(2): 303–311p, 2004.
- Caetano, F. H., Jaffé, K., Zara, F. J. *Formigas: biologia e anatomia*. Rio Claro: Gráfico e Editor Topázio. 2002.
- Chirumamilla P., Dharavath S. B, Taduri S. GC-MS profiling and antibacterial activity of *Solanum khasianum* leaf and root extracts. *Bull Natl Res Cent*. 46(1):127, 2022.
- Dahbi, A., Hefetz, A., Lenoir, A. Chemotaxonomy of some Cataglyphis ants from Morocco and Burkina Faso. *Biochem. Syst. Ecol*. 36:564-572p, 2008.
- Delsinne, T., Sonet, G., Aries-Penna, T. M. Subfamilia Paraponerinae. In: Fernández, F., Guerreiro, R. J., Dilsinne, T. (org) *Hormigas de Colombia*. Bogotá, Colombia: National University of Colombia. 637-657p. 2019.

- Della Lucia, T. M. C.; Souza, D. J. Importância e história de vida das formigas cortadeiras. In: Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo. Viçosa: UFV, 13- 26p, 2011.
- Della Lucia, T. M. C.; Gandra, L. C.; Guedes, R. N. C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest management science*, 70 (1): 14-23p, 2014.
- D’Ettorre, P., Christine Errard, C., Ibarra, F., Francke, W., Hefetz, A. Sneak in or repel your enemy: Dufour’s gland repellent as a strategy for successful usurpation in the slave-maker *Polyergus rufescens*. *Chemoecology*. 10:135-142p, 2000.
- Espelie, K. E., Wenzel, J. W., Chang, G. Surface lipids of social wasp *Polistes metricus* say and its nest and nest pedicel and their relation to nestmate recognition. *Journal of Chemical Ecology*, 16: 2229-2241p, 1990.
- Evershed, R. P., Morgan, E. D. Chemical investigations of the Dufour gland contents of attine ants. *Insect Biochem*. 11:343-351p, 1981.
- Fanfani, A., Giovannotti, M. Metapleural glands in *Crematogaster clariventris* Mayr and *C. depressa* Latr. (Formicidae, Myrmicinae). *Accad. Naz. dei Lincei* 267: 259–265p, 1994.
- Fernández, F., Guerreiro, R. J. Subfamilia Ponerinae. In: Fernández, F., Guerreiro, R. J., Dilsinne, T. Hormigas de Colombia. Bogotá, Colombia: National University of Colombia. 509-553p. 2019.
- Fernández, F., Guerreiro, R. J., Dilsinne, T. Hormigas de Colombia. Bogotá, Colombia: National University of Colombia. 2019.
- Fernandez, F., Guerrero, R. J., Sánchez-Restrepo, A. F. Systematics and diversity of Neotropical ants. *Revista Colombiana De Entomología*, 47(1), 1–20p. 2021.
- Frega, N., Bocci, F., Lercker, G. High-resolution gas chromatographic determination of alkanols in oils extracted from olives. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70: 919–921p, 1993.

- Gołębiowski, M., Boguś, M. I., Paszkiewicz, M., Stepnowski, P. Cuticular lipids of insects as potential biofungicides: methods of lipid composition analysis. *Anal Bioanal Chem.* 399(9): 3177-91p, 2011.
- Govindarajan, N., Cheekala, U. M. R., Arcot, S., Sundaramoorthy, S., Duraisamy, R., Raju, I. GC-MS Analysis of n-hexane extract of stem bark of *Symplocos cretaegoides* Buch.-Ham. Ex D. Don. *Pharmacognosy Journal* 8(6): 520-524p, 2016.
- Guillem, R. M., Drijfhout, F. P., Martin, S. J. Species-specific cuticular hydrocarbon stability within European *Myrmica* ants. *Journal of Chemical Ecology*, 42:1052-1062p, 2016.
- Gunadi, B., Verhoef, H. A. The flow of nutrients in a *Pinus merkusii* forest plantation in Central Java: the contribution of soil animals. *European Journal of Soil Biology*, 29: 133-139p, 1993.
- Gusmão, L. G., Caetano, F. H., Nakano, O. Ultramorphology of the metapleural gland in three species of *Atta* (Hymenoptera, Formicidae). *Iheringia* 91: 33-36p, 2001.
- Harvey, D. J., Tiffany, J. M., Duerden, J. M., Pandher, K. S., Mengher, L. S. Identification by combined gas chromatography-mass spectrometry of constituent long-chain fatty acids and alcohols from the meibomian glands of the rat and a comparison with human meibomian lipids. *J. Chromatogr.* 414: 253–263p, 1987.
- Haverty, M.I., Page, M., Nelson, L.J., Blomquist, G. J. Cuticular hydrocarbons of dampwood termites, *Zootermopsis*: Intra- and intercolony variation and potential as taxonomic characters. *J Chem Ecol* 14: 1035–1058p, 1988.
- Haverty, M. I., Nelson, L. J., Page, M. Cuticular hydrocarbons of four populations of *Coptotermes formosanus* Shiraki in the United States. *J Chem Ecol* 16, 1635–1647p, 1990.
- Hölldobler, B., Engel-Siegel, H. On the metapleural gland of ants. *Psyche* 91, 070141. 1984.
- Hölldobler, B., Wilson, E. O. *The ants*. Harvard University Press, Cambridge, UK. 1990.

- Junqueira, L. K., Diehl, E. The Metapleural Secretion of *Acromyrmex laticeps* (Forel) does not have Fungicide Effect on the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Entomo Brasilis, 7: 207-210p, 2014.
- Jackson, B. D., Morgan, E. D. Insect chemical communication: Pheromones and exocrine glands of ants. Chemoecology, 1993.
- Jaffe, K., Puche, H. Colony-specific territorial marking with the metapleural gland secretion in the ant *Solenopsis geminata* (Fabr). J insect physiol 30: 265-270p, 1984.
- Katz, D. H., Marcelletti, J. F., Pope, L. E., Khalil, M. H., Katz, L. R., Mcfadden, R. N-docosanol: broad spectrum anti-viral activity against lipid-enveloped viruses. Ann. N. Y. Acad. Sci. 724: 472–488p, 1994.
- Lacerda, F., Della Lucia, T., Pereira, O., Peternelli, L., Tótola, M. Mortalidade de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) em contato com resíduos de colônias de diferentes origens vegetais. Boletim de Pesquisa Entomológica, 100 (1), 99-103p, 2010.
- Lapola, D. M., Bruna, E. M., Vasconcelos, H. L. Amizade tênue: mutualismo entre plantas e formigas na Amazônia. Ciência Hoje, 34(204): 29-33p, 2004.
- Mackay, W. P., Mackay, E. E. The systematics and biology of the New World ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera: Formicidae). Lewiston, New York: Edwin Mellen Press, 12: 642p. 2010.
- Managamuri, U., Vijayalakshmi, M., Ganduri, V.S.R.K., Rajulapati, S. B., Bonigala, B., Kalyani B. S., Poda, S. Isolation, identification, optimization, and metabolite profiling of *Streptomyces sparsus* VSM-30. 3 Biotech 7(3): 217, 2017.
- Marciniak, P., Szymczak, M., Rosinski, G. Hormony peptydowe owadów-przeład najważniejszych rodzin, Postępy biologii komórki 38: 43–63p, 2011.

- Marcelletti, J. F., Lusso, P., and Katz, D. H. N-Docosanol inhibits in vitro replication of HIV and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 12: 71–74p, 1996.
- Martins, L. C. B., Do Nascimento, F. S., Campos, M. C. G., Lima, E. R., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E. Chemical composition of the intramandibular glands of the ant *Neoponera villosa* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Ponerinae). *Chemoecology.* 25:25-31p, 2015.
- Martins, L. C.B., Serrão, J. E., Santos, H. P., Araújo, V. A. Anatomy and histology of the metapleural gland in the giant tropical ant *Paraponera clavata* (Fabricius, 1775) (Formicidae: Paraponerinae). *An Acad Bras Cienc* 94(2), 2022.
- Maschwitz, U., Koob, K., Schildknecht, H. Ein Beitrag zur Funktion der Metapleuraldrüse der Ameisen. *J Insect Physiol* 16:387-404p, 1970.
- Mehdiabadi, N. J., Schultz, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News* 13: 37-55p. 2009.
- Meskali, M., Bonavita-Cougourdan, A., Provost, E., Bagnères, A., Dusticier, A. G., Clement, J. L. Mechanism underlying cuticular hydrocarbon homogeneity in the ant *Camponotus vagus* (scop.) (Hymenoptera: Formicidae): role of postpharyngeal glands. *Journal of Chemical Ecology*, 21(8), 1995.
- Mohanasundaram, A., Kaprakkaden, A., Nebapure, S.M. et al. Electroantennography and behavioral studies of *Eublemma amabilis* [Moore] and *Pseudohypatopa pulverea* [Meyr] in relation to volatiles of lac insect (*Kerria lacca* Kerr.) and its associated products. *Int J Trop Insect Sci* 42: 2313–2324p, 2022.
- Moreau, C. S., Bell, C. D. Testing the museum versus cradle tropical biological diversity hypothesis: phylogeny, diversification, and ancestral biogeographic range evolution of the ants. *Evolution* 67: 2240–2257p, 2013.

- Morgan, E. D., Do Nascimento, R. R., Keegans, S. J., Billen, J. Comparative study of mandibular gland secretions of Workers of ponerine ants. *J. Chem. Ecol.* 25: 1365-1409p, 1999.
- Morgan, E. D., Jungnickel, H., Keegans, S. J., Do Nascimento, R. R., Billen, J., Gobin, B., Ito, F. Comparative survey of abdominal gland secretions of the ant subfamily Ponerinae. *J. Chem. Ecol.* 29: 95-114p, 2003.
- Morrison, W. H. Variation in the wax content of sunflower seed with location and hybrid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60: 1013–1014p, 1983.
- Naccarato, A., Cavaliere, F., Tassone, A., Brandmayr, P., Tagarelli, A., Pirrone, N., Sprovieri, F., & Giglio, A. In vivo solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC-MS) assay to identify epicuticular profiles across task groups of *Apis mellifera ligustica* workers. *Journal of Entomological and Acarological Research*, 51(1), 2019.
- Nascimento, R., Schoeters, E., Morgan, D., Billen, J. & Stradling, D.J. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes*, and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Chemical Ecology*, 22: 987- 1000p, 1996.
- Nicolaidis, N. The monoene and other wax alcohols of human skin surface lipid and their relation to the fatty acids of this lipid. *Lipids* 2: 266–275p, 1967.
- Noirot, C. Glands and secretions. In: Krishna, K., Weesner, F. (Eds.). *Biology of Termites*. New York: Academic Press. 89-123p, 1969.
- Noirot, C., Quennedey, A. Fine structure of insect epidermal glands. *A Rev Entomol* 19: 61-80p, 1974.
- Olusola, L., Solomon, M., Maduka, H. Proximate chemical analysis of *Zonocerus variegatus* (giant grasshopper), *Nig. J. Biotech.* 14: 42–45p, 2003.

- 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. *Journal of Chemical Ecology*. 26: 1667-1683p, 2000.
- Ortius-Lechner, D., Maile, R., Morgan, E.D., Petersen, H.C., Boomsma, J.J. Lack of patriline-specific differences in chemical composition of the metapleural gland secretion in *Acromyrmex octospinosus*, *Insectes Sociaux*, 50: 113-119p, 2003.
- Passos, F. C. S., Leal, L. C. Protein matters: ants remove herbivores more frequently from extrafloral nectary-bearing plants when habitats are protein poor. *Biological Journal of the Linnean Society*. 127:407-416p, 2019.
- Peeters, C. Castas: homología y analogía en la forma y función. In: Fernández, F., Guerreiro, R. J., Dilsinne, T. (org) *Hormigas de Colombia*. Bogotá, Colombia: National University of Colombia. 159-164p. 2019.
- Pech, P., Billen, J. Structure and development of the metapleural gland in *Technomyrmex vitiensis*. *Insectes Sociaux*, 64:387-392p, 2017.
- Penick, C., Halawani, O., Pearson, B., Mathew, S., LópezUribe, M. M., Dunn, R. R., Smith, A. A. External immunity in ant societies: sociality and colony size do not predict investment in antimicrobials. *Royal Society Open Science*, 5: 1-8p, 2018.
- Pereira, M. C., Firmino, E. L. B., Bernardi, R. C., Lima, L. D., Guimarães, I. C., Cardoso, C. A. L., Antonialli Junior, W. F. Dear Enemy phenomenon in the ant *Ectatomma brunneum* (Formicidae: Ectatomminae): Chemical signals mediate intraspecific aggressive interactions. *Sociobiology*, 66 (2): 218–226p, 2019.
- Poulsen, M., Bot, A., Nielsen, M., Boomsma, J. Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 52(2): 151–157p. 2002.

- Provost, E., Blight, O., Tirard, A., Renucci, M. Hydrocarbons and insects' social physiology. *Insect Physiol. New Res.* 19-72p, 2008.
- Radler, F. The surface lipids of fresh and processed raisins. *J. Sci. Food Agric.* 16: 638–643p, 1965.
- Rodríguez-Flores, M. S., Falcão, S. I., Escuredo, O., Seijo, M. C., Vilas-Boas, M. Chemical profile from the head of *Vespa velutina* and *V. crabro*. *Apidologie* 52, 548–560p, 2021.
- Romero-López, A. A., Reyes-Chilpa, R., Pérez-Flores, F. J., Lugo-García, G. A., Maldonado-Rodríguez, J. I. Chemicals in the genital chamber of two Mexican species of Phyllophaga. *Southwest. Entomol.* 44:457-464p, 2019.
- Rosumek, F. B. Natural History of Ants: What We (do not) Know about Trophic and Temporal Niches of Neotropical Species. *Sociobiology.* 64:244-255p, 2017.
- Scarparo, G., D’Ettorre, P., Di Giulio, A. Chemical deception and structural adaptation in *Microdon* (Diptera, Syrphidae, Microdontinae), a genus of hoverflies parasitic on social insects. *J. Chem. Ecol.* 45: 959-971p, 2019.
- Souza A. L. B., Soares, I. M. F., Cyrino, L. T., Serrão, J. E. The metapleural gland of two subspecies of *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 47(1): 19-25p, 2006.
- Staczek, S., Cytrynska, M., Zdybicka-Barabas, A. Unraveling the Role of Antimicrobial Peptides in Insects. *International Journal of Molecular Sciences*, 24: 5753, 2023.
- Sturgis, S. J., Greene, M. J., Gordon, D. M. Hidrocarbonetos em Formigas Colhedoras (*Pogonomyrmex barbatus*) Míddens Guide Forrageiras para o Ninho. *J Chem Ecol* 37: 514–524p, 2011.
- Tragust, S. External immune defense in ant societies (Hymenoptera: Formicidae): the role of antimicrobial venom and metapleural gland secretion. *Myrmecological News*, 23:119-128p, 2016.

- Tranter, C., Fernandez-Marin, A., Hughes, W. O. Quality and quantity: transitions in antimicrobial gland use for parasite defense. *Ecology and Evolution*, 5: 5857-5868p, 2015.
- Tullio, A. D., Angelis, F. D., Reale, S., Grasso, D. A., Visicchio, R., Castracani, C., Mori, A., Moli, F. L. Investigation by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry of trail pheromones in ants. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(18), 2071–2074p, 2003.
- Tulloch, G. S., Shapiro, J. E., Hershenov, B. The ultrastructure of the metasternal glands of ants. *Bull. Brooklyn Entomol. Soc.* 57, 91–101p. 1962.
- Tulloch, A. P. “Chemistry of waxes of higher plants” in *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*. ed. P. E. Kolattukudy (Amsterdam: Elsevier), 1976.
- Ulmer, J. M., Mikó, I., Richter, A., Helms, A., Van de Kamp, T., Krogmann, L. ‘Social glands’ in parasitoids? – convergent evolution of metapleural glands in Hymenoptera, *Insect Systematics and Diversity*, 7(2), 2023.
- Vanitha, V., Vijayakumar, S., Nilavukkarasi, M., Punitha, V. N., Vidhya, E., Praseetha, P. K. Heneicosane—A novel microbicidal bioactive alkane identified from *Plumbago zeylanica* L. *Industrial Crops and Products*, 154: 112748, 2020.
- Vieira, A. S., Bueno, O. C., Camargo-Mathias, M. I. Morphophysiological differences between the metapleural glands of fungus-growing and non- fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae). *PLoS ONE* 7(8): e43570. 2012a.
- Vieira, A. S., Morgan, D. E., Drijfhout, F. P., Camargo-Mathias, M. I. Chemical composition of metapleural gland secretions of fungus-growing and non-fungusgrowing ants. *J Chem Ecol* 38: 1289-1297, 2012b.

- Vieira, A. S., Camargo-Mathias, M. I., Roces, F. Comparative morpho-physiology of the metapleural glands of two *Atta* leaf-cutting ant queens nesting in clayish and organic soils. *Arthropod Structure & Development*, 44(5):444–454p, 2015.
- Wang, C., Chung, F., Lin, C., Katzke, J., Economo, E. P., Billen, J. Morphology og the metapleural gland and its associated novel atrial cone gland in *Strumigenys* ants. *Micron*, 171, 2023.
- Wilson, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: *Atta*). In: The overall pattern in *A. sexdens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 7: 143-156p. 1980.
- Wilson, E. O., Hölldobler, B. Eusociality: origin and consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of America*, 102 (38): 1336713371, 2005.
- Ward, P. S. The phylogeny and evolution of ants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45: 23-43p, 2014.
- Yek, S. H., Nash, D.R., Jensen, A.B., Boomsma, J. J. Regulation and specificity of antifungal metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Proceedings of the Royal Society B*, 279: 4215-4222p, 2012.
- Yusuf, A. A., Pirk, C. W. W., Crewe, R. M., Njagi, P. G. N., Gordon, I., Torto, B. Nestmate recognition and the role of cuticular hydrocarbons in the African termite raiding ant *Pachycondyla analis*. *J. Chem. Ecol.* 36:441-448p, 2010.
- Zorzetto C, Sánchez-Mateo CC, Rabanal RM, Lupidi G, Petrelli D, Vitali LA, Bramucci M, Quassinti L, Caprioli G, Papa F, Ricciutelli M, Sagratini G, Vittori S, Maggi F. Phytochemical analysis and in vitro biological activity of three *Hypericum* species from the Canary Islands (*Hypericum reflexum*, *Hypericum canariense* and *Hypericum grandifolium*). *Fitoterapia*.100: 95-109p, 2015.