

ERIKA VANESSA DA COSTA CARVALHO SOUSA

**MORFOLOGIA E VOLATILÔMICA DAS GLÂNDULAS PRÉ-
FARÍNGEAS E FARÍNGEAS DE OPERÁRIAS DE *Paraponera clavata*
(HYMENOPTERA: PARAPONERINAE) E *Pachycondyla crassinoda*
(HYMENOPTERA: PONERINAE)**

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

2024

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

T

S725m
2024
Sousa, Erika Vanessa da Costa Carvalho, 2000-
Morfologia e volatilômica das glândulas pré-faríngeas e
faríngeas de operárias de *Paraponera clavata* (Hymenoptera:
Paraponerinae) e *Pachycondyla crassinoda* (Hymenoptera:
Ponerinae) / Erika Vanessa da Costa Carvalho Sousa. – Viçosa,
MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (61 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Eduardo Serrão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2024.

Referências bibliográficas: f. 50-61.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.483>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Hymenoptera. 2. Formigas. 3. Glândulas exócrinas.
4. Composição química. 5. Animais - Comportamento social.
I. Serrão, José Eduardo, 1965-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Entomologia. III. Título.

CDD 22. ed. 595.79

ERIKA VANESSA DA COSTA CARVALHO SOUSA

MORFOLOGIA E VOLATILÔMICA DAS GLÂNDULAS PRÉ-FARÍNGEAS E FARÍNGEAS DE OPERÁRIAS DE *Paraponera clavata* (HYMENOPTERA: PARAPONERINAE) E *Pachycondyla crassinoda* (HYMENOPTERA: PONERINAE)

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: 16/07/2024

Assentimento:



Documento assinado digitalmente
ERIKA VANESSA DA COSTA CARVALHO SOUSA
Data: 09/08/2024 16:12:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Erika Vanessa da Costa Carvalho Sousa

Autora



Documento assinado digitalmente
JOSE EDUARDO SERRAO
Data: 09/08/2024 16:02:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

José Eduardo Serrão

Orientador

*A meus pais Eva e José, a minha irmã Eduarda e
a meu marido Carlos.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, APQ-02367-18, APQ-00856-19, APQ-02486-22) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 403986/2021-4, 303243/2022-8).

A Deus.

Aos meus pais, Eva e José, e a minha irmã Eduarda que sempre estiveram ao meu lado, oferecendo suporte incondicional, palavras de sabedoria e um amor inabalável que foi fundamental para alcançar este marco em minha jornada acadêmica.

Ao meu marido, Carlos por ser minha âncora e meu maior incentivador. Sua presença e apoio tornaram esta jornada possível e significativa. Sou profundamente grato por ter você ao meu lado.

Ao meu orientador, Dr. José Eduardo Serrão, agradeço profundamente pela sua orientação, apoio, paciência e sabedoria ao longo deste trabalho. Sua dedicação e orientação foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e profissional.

Às minhas amigas Elane, Paulinha e Iuly. Gostaria de expressar minha profunda gratidão pelo apoio constante, pela amizade sincera, pelas risadas, pelos passeios, pelos lanches e pelos momentos compartilhados ao longo desta jornada.

Aos companheiros de laboratório, em especial à Laryssa, Álvaro, Giovana, e Matheus Tudor. Agradeço por tornarem o ambiente de trabalho tão agradável e por estarem sempre dispostos a ajudar e compartilhar experiências. Pelos momentos de colaboração, aprendizado e, é claro, muita descontração nos cafés da tarde.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, pela disponibilidade dos equipamentos.

E a todas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

*“O que separa os vencedores dos perdedores não
é a força, nem o talento, mas a determinação”*

Bear Bryant

RESUMO

SOUSA, Erika Vanessa da Costa Carvalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2024. **Morfologia e volatilômica das glândulas pré-faríngeas e faríngeas de operárias de *Paraponera clavata* (Hymenoptera: Paraponerinae) e *Pachycondyla crassinoda* (Hymenoptera: Ponerinae).** Orientador: José Eduardo Serrão

As formigas são amplamente distribuídas em quase todos os ecossistemas terrestres e são classificadas como insetos eusociais, devido ao seu alto grau de socialização e características sociais bem definidas. Elas possuem um sistema complexo de glândulas exócrinas que produzem substâncias essenciais para a manutenção social. Entre essas glândulas, as pré-faríngeas e faríngeas são as mais proeminentes na cabeça da formiga, embora suas funções ainda não sejam totalmente compreendidas. A caracterização morfológica destas glândulas em *Paraponera clavata* e *Pachycondyla crassinoda* é limitada, ressaltando a importância de sua análise para contribuir com a compreensão das funções no comportamento das formigas. O objetivo foi comparar a morfologia e compostos das glândulas pré-faríngeas e faríngeas em operárias de *P. clavata* e *P. crassinoda*. As glândulas pré-faríngeas e faríngeas foram examinadas por microscopia de luz, eletrônica de varredura e em cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os resultados revelam que ambas as glândulas diferem tanto em anatomia quanto em histologia entre as duas espécies. A glândula pré-faríngea de *P. clavata* é volumosa, alongada e com complexos sistemas de ductos, enquanto em *P. crassinoda* elas são menores em formato de cachos de uvas e com uma única abertura para liberação da secreção na faringe. O volume da glândula pré-faríngea apresenta correlação positiva com o tamanho corporal de *P. clavata*, mas não com *P. crassinoda*. As análises histoquímicas desta glândula indicam diferenças na presença de proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos e lipídios entre as espécies. Essas variações sugerem adaptações específicas relacionadas à função glandular, possivelmente relacionados com a produção de enzimas. As glândulas faríngeas de *P. clavata* e *P. crassinoda* apresentam diferenças na anatomia e histologia entre as formigas analisadas. Enquanto *P. clavata* exibe a glândula com inúmeras projeções tubulares, em *P. crassinoda* ela formada por dois lóbulos distintos. Além disso, as análises histológicas e histoquímicas demonstraram variações na histologia e na intensidade de reações entre as duas espécies, possivelmente adaptadas à função da glândula faríngea na comunicação química entre os co-específicos. Os compostos químicos produzidos nas

glândulas de ambas as espécies são predominantemente formados por hidrocarbonetos, sugerindo um potencial envolvimento da glândula faríngea na síntese e liberação de hidrocarbonetos para a comunicação dentro das colônias das formigas estudadas. Esses resultados inéditos para *P. clavata* e *P. crassinoda* evidenciam a importância das glândulas pré-faríngea e faríngea nas funções metabólicas e comunicação química nas colônias de formiga.

Palavras-chave: Formigas; Glândulas exócrinas; Composição química; Comportamento social.

ABSTRACT

SOUSA, Erika Vanessa da Costa Carvalho, M.Sc., Federal University of Viçosa, July, 2024.

Morphology and volatilomic of the prepharyngeal and pharyngeal glands of *Paraponera clavata* (Hymenoptera: Paraponerinae) and *Pachycondyla crassinoda* (Hymenoptera: Ponerinae) Workers. Adviser: José Eduardo Serrão.

Ants are widely distributed across almost all terrestrial ecosystems and are classified as eusocial insects due to their high level of socialization and well-defined social characteristics. They possess a complex system of exocrine glands that produce substances essential for social maintenance. Among these glands, the prepharyngeal and pharyngeal glands are the most prominent in the ant's head, though their functions are not yet fully understood. The morphological characterization of these glands in Paraponerinae and Ponerinae ants is limited. This study compared the morphology and the compounds of the pre-pharyngeal and pharyngeal glands in workers of *Paraponera clavata* and *Pachycondyla crassinoda*. The pre-pharyngeal and pharyngeal glands were examined with light and scanning electron microscopies, and gas chromatography coupled to mass spectrometry. The pre-pharyngeal gland of *P. clavata* is well-developed with elongated collecting duct cells, whereas in *P. crassinoda* they are small like grape-shape clusters with a single opening for secretion release into the pharynx. This gland has a positive correlation between volume and body size in *P. clavata*, but not in *P. crassinoda*. Histochemical tests indicate differences in the proteins, glycoproteins, carbohydrates, and lipids content between the two ants. These variations suggest specific adaptations related to gland function, possibly linked to digestive enzyme production. The pharyngeal gland *P. clavata* has many finger-like tubular projections, whereas in *P. crassinoda* it has two lobes. Furthermore, they have different epithelial and histochemical features between the two species, suggesting adaptations production of chemical compounds for nestmate communication. The chemical compounds identified in the glands of both species were mainly hydrocarbons, suggesting a potential role of the pharyngeal gland in hydrocarbon synthesis for interspecific communication. These results for *P. clavata* and *P. crassinoda* highlight the importance of the prepharyngeal and pharyngeal glands in the metabolic functions and chemical communication within ant colonies.

Keywords: Ants; Exocrine glands; Chemical composition; Social behavior.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1 <i>Material biológico</i>	15
2.2 <i>Estereomicroscopia</i>	15
2.3 <i>Microscopia de luz</i>	15
2.4 <i>Histoquímica</i>	16
2.5 <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	16
2.6 <i>Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas</i>	16
2.7 <i>Análises estatísticas</i>	17
3. RESULTADOS	18
3.1 Glândula pré- faríngea	18
3.1.1 <i>Anatomia</i>	18
3.1.2 <i>Histologia</i>	21
3.1.3 <i>Histoquímica</i>	26
3.2 Glândula faríngea	28
3.2.1 <i>Anatomia</i>	28
3.2.2 <i>Histologia</i>	32
3.2.3 <i>Histoquímica</i>	35
3.3 Compostos químicos do complexo pré-faríngea e faríngeana	37
4. DISCUSSÃO	42
4.1 Glândula pré-faríngea	42
4.2 Glândula faríngea	44
4.3. Compostos químicos do complexo pré-faríngea e faríngeana	45
5. CONCLUSÃO	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

As formigas são amplamente distribuídas e estão presentes em todos os ecossistemas terrestres, exceto Antártica, principalmente devido às suas capacidades de adaptação a diferentes habitats (Guarda & Lutinski, 2020). Neste contexto, estima-se que atualmente a biomassa de formigas ultrapasse a soma daquelas combinadas de aves e mamíferos selvagens, representando cerca de 20% da biomassa humana, posicionando estes insetos como um dos grupos de animais ecologicamente dominantes (Schultheiss et al., 2022).

Estes insetos possuem alto grau de socialização e são classificados como eusociais devido a sobreposição de gerações, presença de castas reprodutivas e estéreis e cuidado cooperativo com a prole (Hölldobler & Wilson, 1990). Suas características sociais são bem definidas dentro do ninho, incluindo a divisão de tarefas entre e dentre as castas. Essa divisão é influenciada por fatores como idade (Moroñ et al., 2008), nutrição (Smith et al., 2011), genética (Waddington et al., 2010), experiência (Ravary et al., 2007; Muscedere et al., 2009) e morfologia do indivíduo (Hölldobler & Wilson, 1990).

Formicidae é composta por 23 subfamílias, 511 gêneros e 15.896 espécies (AntWeb, 2024). No Brasil, há ocorrência de 1.541 espécies distribuídas em 124 gêneros, destacando o país como um dos maiores detentores de diversidade de formigas das Américas e uma das maiores do mundo (Baccaro et al, 2015; AntWeb, 2024).

Nas formigas, o grupo de poneromorfos é composto por Paraponerinae e Ponerinae, consideradas atualmente como grupos irmãos por possuírem uma relação monofilética (Fernandez et al., 2021)

Paraponerinae é exclusivamente neotropical e possui apenas uma espécie vivente, *Paraponera clavata* (Fabricius, 1775) que está distribuída nas florestas tropicais brasileiras. Além do seu tamanho consideravelmente grande, com as operárias podendo alcançar 2,5 cm, outra característica marcante de *P. clavata* são seus escobos antenais em forma de “V” invertido, que se curvam para cima estendendo-se para trás dos olhos compostos (Baccaro et al., 2015). O forrageio dessa espécie ocorre geralmente de forma solitária no dossel das árvores, podendo percorrer grandes distâncias, passando de uma árvore para outra, formando um grande território tridimensional (Young & Hermann, 1980; Baader, 1996). Seus ninhos são encontrados principalmente na base dos troncos das árvores, além de áreas de cultivo e restolho, comportamentos que facilitam a adaptação de *P. clavata* a diferentes ambientes (Arias-Penna, 2008; Baccaro et al., 2015).

Apesar desta espécie ser considerada por muito tempo monomórfica, as operárias

apresentam crescimento alométrico e distribuição de tamanho desigual, onde as formigas que forrageiam e defendem o ninho têm a cabeça maior e mais larga que aquelas que permanecem na colônia, podendo indicar a presença de subcastas (Breed e Harrison 1988; Breed, 2002; Delsinne, 2019)

Em Ponerinae, o gênero *Pachycondyla* se destaca por ser numeroso e Pantropical, com ampla distribuição na América do Sul (Tudor et al., 2016). Dentre as espécies deste gênero, a formiga Neotropical *Pachycondyla crassinoda* (Latreille, 1802) se destaca como a maior espécie do seu gênero, com operárias negras que podem atingir um comprimento de quase 2 cm, com mandíbulas triangulares e hábitos alimentares de predadoras generalistas (MacKay & MacKay, 2010).

Pachycondyla crassinoda geralmente é encontrada nidificando sob troncos apodrecidos ou entre raízes de árvores. As operárias são comumente encontradas forrageando na floresta tropical, serapilheira e nas bordas da floresta, com o forrageio ocorrendo estritamente no solo. Além disso, essas formigas possuem comportamento de tandem-running para o recrutamento em busca de alimento, onde uma formiga líder guia as demais que a seguem de perto em uma fileira (MacKay & MacKay, 2010; Baccaro et al, 2015; Tudor et al. 2016;).

Assim como outros insetos sociais, as formigas são dotadas de um complexo e abundante sistema de glândulas exócrinas, responsáveis pela produção e secreção de grande variedade de substâncias com função, principalmente, na manutenção social das colônias (Boonen & Billen, 2016; Niculita et al., 2007). Essas substâncias podem atuar sob diversos comportamentos, como interações de dominância, determinação da casta rainha, recrutamento para a fundação de novas colônias e comportamento reprodutivo (Amaral & Caetano, 2006). Além disso, os compostos glandulares estão envolvidos na função de alarme e defesa (Hölldobler & Wilson 1990; Richter et al., 2021), reconhecimento de companheiros de ninho, nidificação (Caetano et al., 2002), além de promover a comunicação dentro e fora dos ninhos (Caetano et al, 2002; Billen, 2006).

Dentro do grupo de insetos sociais, as formigas possuem 149 glândulas exócrinas, sendo a maior diversidade de glândulas em insetos (Billen et al. 2020), incluindo as glândulas pré-faríngea e faríngea, que são classificadas como glândulas cefálicas e produzem secreções ativas (Xu et al., 2021).

A glândula pré-faríngea, conhecida anteriormente como glândula pró-faríngea, foi considerada uma característica exclusiva das formigas. No entanto, essa glândula também foi identificada em algumas espécies de vespas Sphecidae solitárias como *Philanthus triangulum* (Fabricius, 1775) e *Ampulex compressa* (Fabricius, 1781) (Herzner et al, 2011). Mas apesar das

semelhanças morfológicas e origens embrionárias homólogas entre as espécies, acredita-se que essas estruturas possuem funções diferentes em ambas as famílias (Serrão et al., 2015).

A glândula pré-faríngea é encontrada na superfície anterior da faringe, localizando-se em ambos os lados da placa faríngeal, próximas da câmara infrabucal, sendo compostas por células secretoras globulares e células ductos, formando canalículos intracelulares, características de células secretoras da classe III, segundo classificação de Noroit & Quennedey (1974). Essa glândula pode abrir-se através de uma placa semelhante a uma peneira (placa crivada) na pré-faringe (Billen & Al-Khalifa, 2015), através de um átrio, antes de sua secreção ser liberada (Billen et al., 2013; Boonen & Billen, 2016) ou através de um sistema de ductos complexos (Xu et al., 2022). Sua função em formigas ainda é desconhecida, mas tem sido geralmente associada à produção de secreções proteicas (Billen & Peusens 1984), enzimáticas (Ayre, 1967) e produtos para o cultivo de fungos nas Attini (Wilson, 1980).

A glândula faríngea era anteriormente denominada como glândula pós-faríngea, no entanto, Richter et al. (2019) revisou o nome para glândula faríngea, após a identificação do ponto preciso de abertura da glândula para a liberação das secreções. Localizada na região dorsal da cabeça, na transição entre faringe e esôfago, está glândula preenche uma porção considerável da placa cefálica (Hölldobler & Wilson, 1990; Caetano, 1998; Niculita et al., 2007).

A glândula faríngea pode apresentar uma morfologia auriculiforme, formada por lóbulos esquerdo e direito (Peregrine et al. 1973, Gama & Cruz-Ladim, 1982; Billen & Al-Khalifa, 2015), ou digitiforme, caracterizadas por um elevado número de expansões laterais (Gama & Cruz-Ladim, 1982; Niculita et al, 2007; Bueno et al. 2008). Em ambas as morfologias existem uma única camada de células secretoras globulares, classificadas como da classe I (Noroit & Quennedey 1974), além da presença de uma cutícula revestindo o lúmen (Almeida Toledo, 1967; Schoeters & Billen, 1997). A função principal desta glândula em formigas parece estar vinculada com a produção do odor da colônia, favorecendo o reconhecimento de companheiras de ninho (Caetano et al., 2002; Lucas et al., 2004; Eelen et al., 2006).

Apesar da importância evidente que estas glândulas podem desempenhar no metabolismo e manutenção social para as formigas, ainda existem muitos pontos a serem compreendidos para uma elucidação completa de suas funções para os Formicidae, principalmente em Ponerinae e Paraponerinae, onde os estudos que buscam entender a atuação e morfologia dessas glândulas são escassos, resultando em uma lacuna de conhecimento que impossibilita a compreensão da diversidade comportamental.

Partindo disso, o presente estudo tem como objetivo comparar a morfologia e os componentes químicos das glândulas pré-faríngeas e faríngeas de operárias de *P. clavata* e *P. crassinoda*, contribuindo para a compreensão das funções dessas glândulas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Material biológico*

Operárias de *P. clavata* e *P. crassinoda* foram coletas manualmente na Área de proteção Ambiental Municipal do Inhamum (4° 53' S 43° 24' O), Caxias, estado do Maranhão. As operárias foram transferidas vivas para o fixador glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2 e transportadas para o Laboratório de Mirmecologia da Universidade Estadual do Maranhão, campus Caxias. A seguir as formigas foram identificadas em nível de gênero com o auxílio da chave taxonômica de Baccaro et al. (2015) e ao nível de espécie por comparação direta com as espécies armazenadas na coleção do Laboratório de Mirmecologia da Universidade Estadual do Maranhão. Posteriormente os espécimes foram transferidos para o Laboratório de Ultraestrutura Celular da Universidade Federal de Viçosa.

2.2 *Estereomicroscópio*

Nove operárias das duas espécies, tiveram a largura da cabeça medida no ponto mais largo (Bulova et al., 2016) como indicação do tamanho do indivíduo, utilizando esteromicroscópio STEMI 2000-C ZEISS (para melhor compreensão está medida será citada a partir de agora como distância interocular). A seguir, as operárias de *P. clavata* e *P. crassinoda* foram dissecadas para obtenção das glândulas pré-faríngeas e faríngeas, e posteriormente foram transferidas para microtubos com 2 mL de etanol a 95%. Posteriormente, as amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio estereomicroscópio Leica M205C com câmera digital acoplada.

2.3 *Microscopia de luz*

Nove operárias de *P. clavata* e nove de *P. crassinoda* foram dissecadas e as glândulas pré-faríngeas e faríngeas desidratadas em série crescente de etanol de 70%, 80%, 90% e 95% com 10 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, e coradas com hematoxilina (20 min) e eosina (30 s) e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 com câmera Olympus QColor 3. Para cada uma das glândulas de cada espécie, foram escolhidas randomicamente 10 secções histológicas com o software Sorteador.com, sendo 90 secções para cada glândula por espécie. A glândula pré-faríngea teve o número de células contado, além da medição das áreas e diâmetro das células secretoras e cálculo do volume glandular ($\text{número de células} \times \frac{4}{3} \pi \times \text{Raio}^3$). A glândula faríngea teve a altura do epitélio medido e área do lúmen. Todas as medidas foram realizadas utilizando o software ImageJ.

2.4 Histoquímica

Outro conjunto de secções histológicas, não coradas, foi submetido aos seguintes testes histoquímicos: mercúrio-bromofenol para detecção de proteínas totais (Pearse, 1953), ácido periódico e Schiff (PAS) para detecção de glicoproteínas e carboidratos neutros (Bancroft & Gamble, 2008) e azul do Nilo para detecção de lipídios ácidos e neutros (Bancroft & Gamble, 1986). Essas amostras foram analisadas e fotografadas conforme descrito na microscopia de luz. Para cada teste histoquímico de cada glândula de ambas as espécies, foram obtidas 18 imagens utilizadas para quantificação de proteínas, carboidratos e lipídios, utilizando o software ImageJ. As imagens foram convertidas de cores RGB (vermelho, verde e azul) para escala de cinza. Em cada imagem foram selecionadas cinco áreas aleatórias de 64x64 pixels para análise de intensidade dos valores de cinza nas imagens (Ustadt, 2022). Para estas análises, 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. 18. 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 Microscopia eletrônica de varredura

Cinco formigas de cada espécie foram dissecadas e suas glândulas pré-faríngeas e faríngeas foram retiradas, desidratadas em séries crescentes de etanol (70, 80, 90 e 99%) transferidas para hexametildisilazano por 5 min e secas em temperatura ambiente. Após este período, as glândulas foram posicionadas em suporte de alumínio, metalizadas com ouro (espessura de 20 nm) e analisadas com microscópio eletrônico de varredura LEO VP1430 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) a 10 kV no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

2.6 Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas

Para a análise dos compostos produzidos pelas glândulas pré-faríngeas e faríngeas, seis operárias de *P. clavata* e *P. crassinoda* foram manualmente coletadas, imobilizadas a -5 °C por 10 min e dissecadas para a retirada das glândulas, que foram transferidas para microtubo e extraídas com 500 µL de hexano PA, durante 10 minutos. A seguir o hexano foi evaporado em temperatura ambiente. A composição química dos extratos glandulares foi determinada por análises em cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

utilizando aparelho Shimadzu GCMS-QP5050A (Shimadzu Europe, Disburg, Alemanha) sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), temperatura inicial da coluna a 40 °C (4 min) e aquecimento gradual a 20 °C/min até 300 °C, mantendo a temperatura final por 25 min; gás de arraste hélio com fluxo de 1,6 mL/min com modo de injeção splitless; temperatura do injetor de 290 °C; volume de injeção 1,0 μ L. Detecção por impacto de elétrons (IE) a 70 eV. modo scan de 35 a 700 (m/z). Os componentes químicos dos extratos foram identificados por comparação de seus espectros de massa com dados da biblioteca do equipamento (Nist 2017). Apenas os compostos cujos espectros de massa apresentaram > 90 % de similaridade com os espectros da biblioteca do equipamento foram considerados identificados.

2.7 *Análise estatística*

Os dados de distância interocular, volume da glândula pré-faríngea, altura do epitélio, diâmetro do lúmen, 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 volume da glândula pré-faríngea e altura do epitélio da glândula faríngea foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Os dados de distância interocular, diâmetro do lúmen e densidades de pixels dos testes histoquímicos foram analisados com um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição gamma, seguindo-se comparação pelo teste de Bonferroni. A relação entre volume da glândula pré-faríngea e a distância interocular assim como altura do epitélio e diâmetro do lúmen em cada uma das duas espécies de formigas 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. Glândula pré-faríngea

3.1.1 Anatomia

Na análise anatômica de *P. clavata* e *P. crassinoda*, a dissecação da glândula pré-faríngea evidenciou a presença de um aglomerado de células secretoras, localizadas bilateralmente ocupando grande parte da curvatura anterior na superfície dorsal da faringe, acima da placa hipofaríngea e em proximidade às glândulas faríngeas.

Cada unidade secretora foi composta de uma célula secretora associada a uma célula ducto, constituindo assim uma unidade bicelular que é característica das células glandulares do tipo III. Tanto em *P. clavata* (Fig. 1A) quanto em *P. crassinoda* (Fig. 2A), estas glândulas apresentaram a mesma coloração branco-transparente.

Em *P. clavata*, o par de glândulas pré-faríngeas preencheu quase integralmente a área da placa faríngea (Fig. 1B). Cada unidade secretora da glândula apresentou aspecto alongado, semelhante a bastonetes, com os ductos convergindo para a região central da placa faríngea (Fig. 1B) em um ducto principal com diâmetro de $25,63 \pm 0,68 \mu\text{m}$ (Fig. 1C). As células secretoras estavam bem desenvolvidas, com diâmetro de $46,70 \pm 1,4 \mu\text{m}$ e as células ducto com diâmetro de $1,4 \pm 0,06 \mu\text{m}$.

A glândula pré-faríngea de *P. crassinoda* apresentou morfologia distinta em comparação com *P. clavata*. Nessa formiga, as glândulas tiveram formato semelhante a cachos de uvas em ambos os lados da placa faríngea (Fig.1B), aparentemente sem uma tendência de ligação entre si. Além disso, as glândulas pré-faríngeas de *P. crassinoda* foram menores que as de *P. clavata*, mas as células secretoras assim como as células ducto, foram maiores em comparação com as da glândula pré-faríngea de *P. clavata*, apresentando células secretoras com diâmetro de $63,68 \pm 2,18 \mu\text{m}$ e as células ducto com diâmetro de $1,5 \pm 0,08 \mu\text{m}$.

Na glândula pré-faríngea de *P. crassinoda* cada célula ducto se conectava em uma região única bilateral da placa faríngea, onde provavelmente, cada célula ducto libera sua secreção (Fig. 2C).

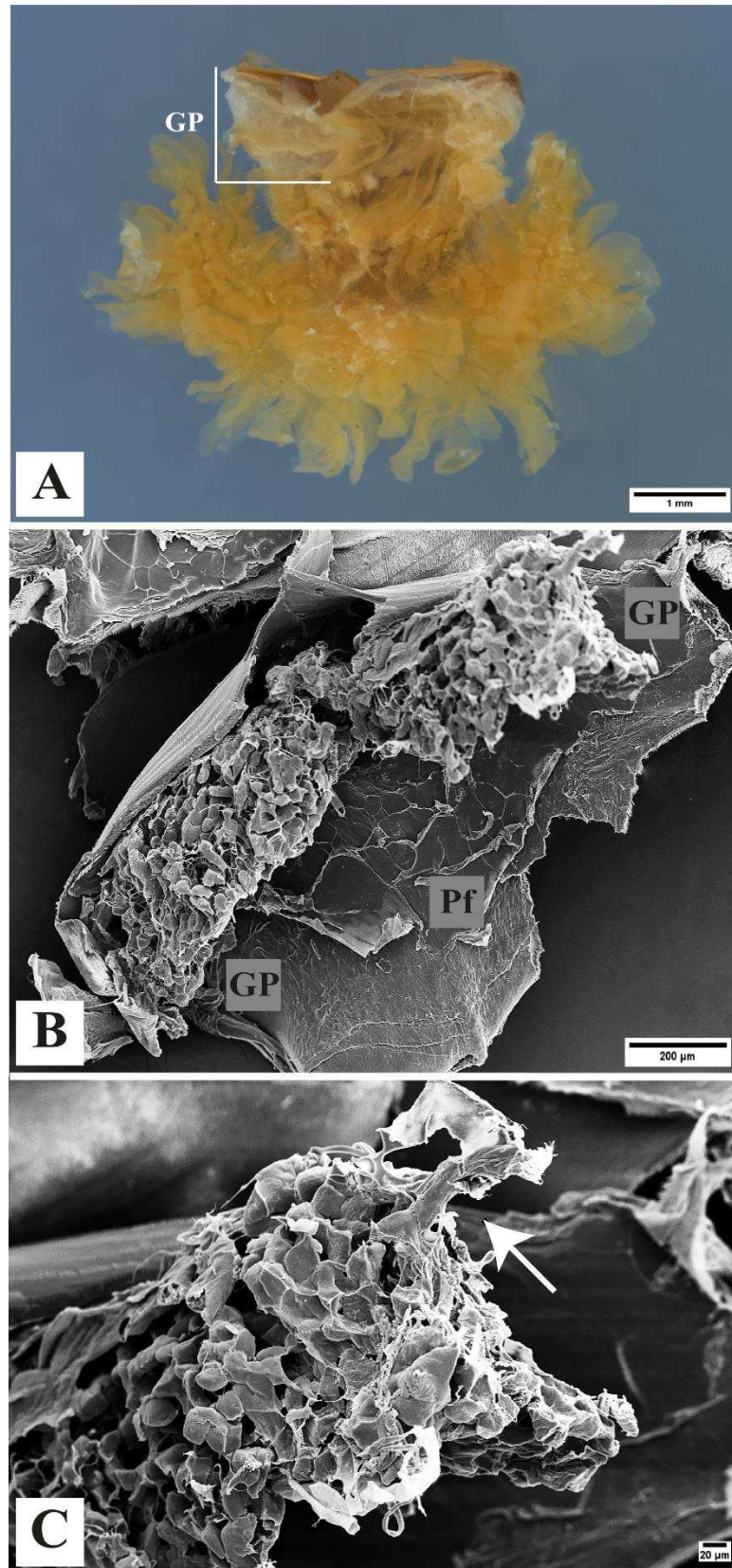


Figura 1. Glândulas pré-faríngeas de operárias de *Paraponera clavata*. **A.** Vista ventral da faringe com as glândulas pré-faríngea (GP) em estereomicroscópio. **B.** Micrografia eletrônica de varredura mostrando o par de glândulas pré-faríngeas (GP) ocupando grande parte da placa faríngeal (Pf). **C.** Micrografia eletrônica de varredura evidenciando o ducto principal (seta) das glândulas pré-faríngeas.

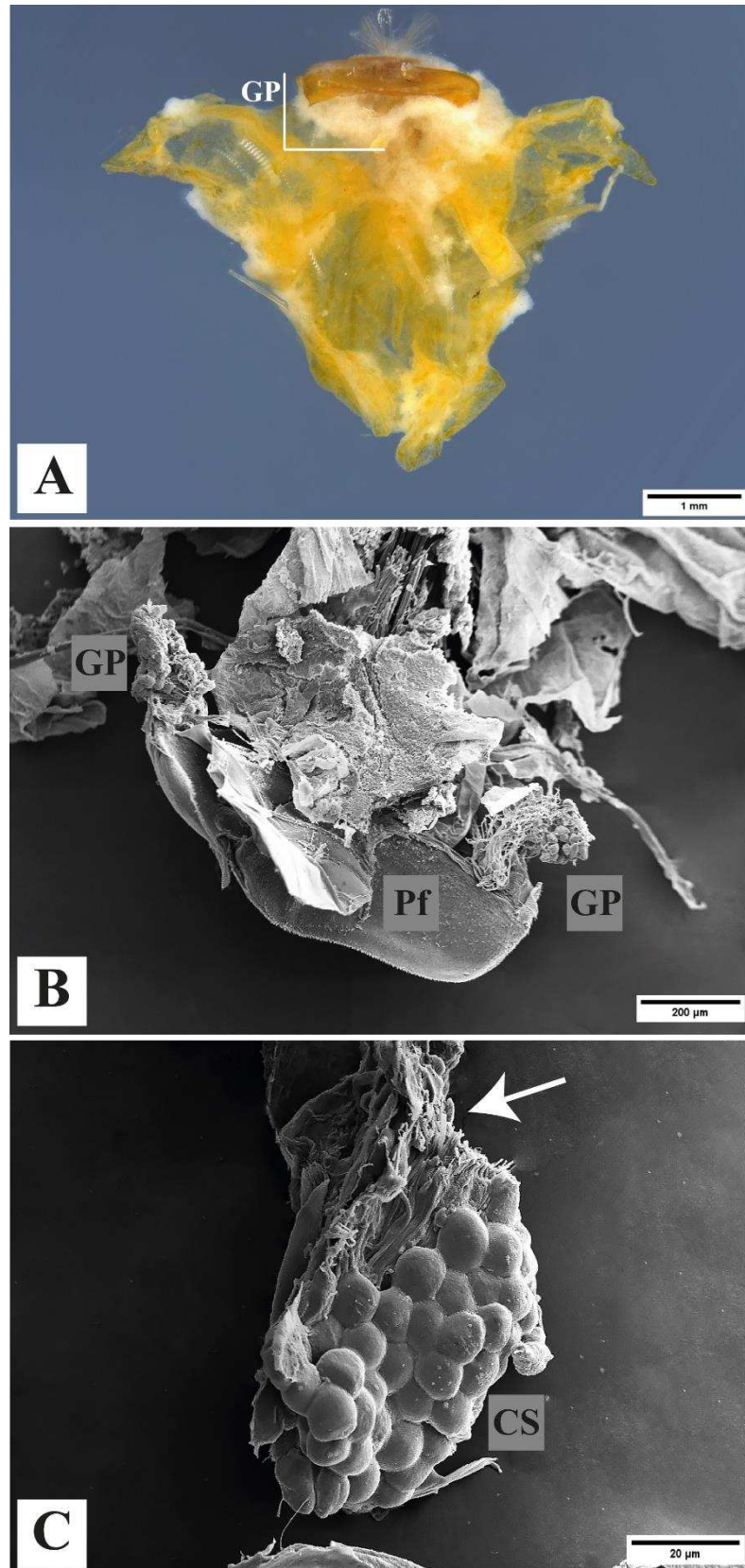


Figura 2. Glândulas pré-faríngeas de operárias de *Pachycondyla crassinoda* **A.** Vista ventral da faringe com as glândulas pré-faríngea (GP) em estereomicroscópio. **B.** Micrografia eletrônica de varredura mostrando as glândulas pré-faríngeas (GP) nas duas extremidades da placa faríngea (Pf). **C.** Micrografia eletrônica de varredura evidenciando as células secretoras (CS) e células ducto (seta).

3.1.2 Histologia

A glândula pré-faríngea de *P. clavata* apresentou células secretoras arredondadas com aparato terminal, grande quantidade de grânulos citoplasmáticos basófilos, núcleo com predomínio de cromatina condensada e nucléolos evidentes (Fig. 3A, B). A glândula de *P. clavata* possuiu número elevado de células secretoras (249 ± 42), com diâmetro de $46,70 \pm 1,4 \mu\text{m}$ e área de $237,89 \pm 14,86 \mu\text{m}^2$. Além disso, os ductos das células secretoras apresentaram diâmetro de $1,4 \pm 0,06 \mu\text{m}$.

A glândula pré-faríngea de *P. crassinoda* apresentou células secretoras globulares com citoplasma apresentando grânulos basófilos e núcleo bem desenvolvido rico em cromatina descondensada e com nucléolos evidentes (Fig. 4A, B). No interior das células secretoras foi possível verificar a presença da célula ducto formando o aparato terminal semelhante a um canalículo intracelular (Fig. 4B). Em média, ocorreram $58 \pm 3,13$ unidades bicelulares, com as células secretoras apresentando diâmetro de $63,68 \pm 2,18 \mu\text{m}$ e área de $489,19 \pm 14,86 \mu\text{m}^2$, enquanto os canalículos tiveram diâmetro de $1,5 \pm 0,08 \mu\text{m}$.

Em *P. clavata*, a glândula secreta através de uma placa crivada alongada, sugerindo a presença de um ducto principal de grande calibre com diâmetro de $25,63 \pm 0,68 \mu\text{m}$ (Fig. 5A). Por outro lado, em *P. crassinoda* apesar das células ductos também se abrirem em uma placa crivada, esta é formado por uma região com poros em ambos os lados da placa faríngea (Fig. 5B)

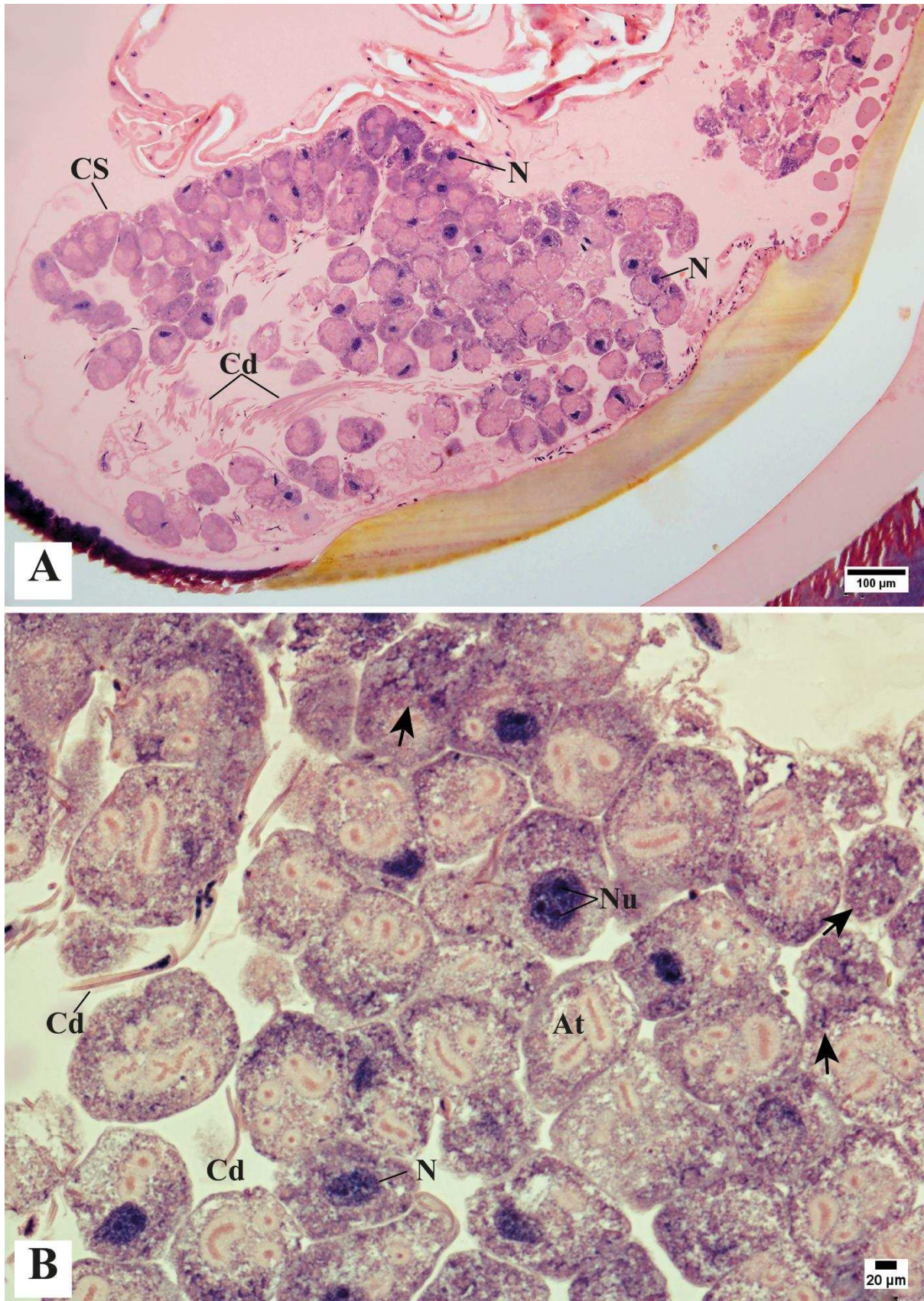


Figura 3. Micrografias de luz da glândula pré-faríngea de *Paraponera clavata*. **A.** Glândula pré-faríngea com as células secretoras (CS) evidenciando núcleos (N), e células ducto (Cd). **B.** Células secretoras com grânulos basófilos (seta) e aparato terminal (At) no citoplasma, núcleo bem desenvolvido (N) com nucléolos (Nu) e células ducto (Cd).

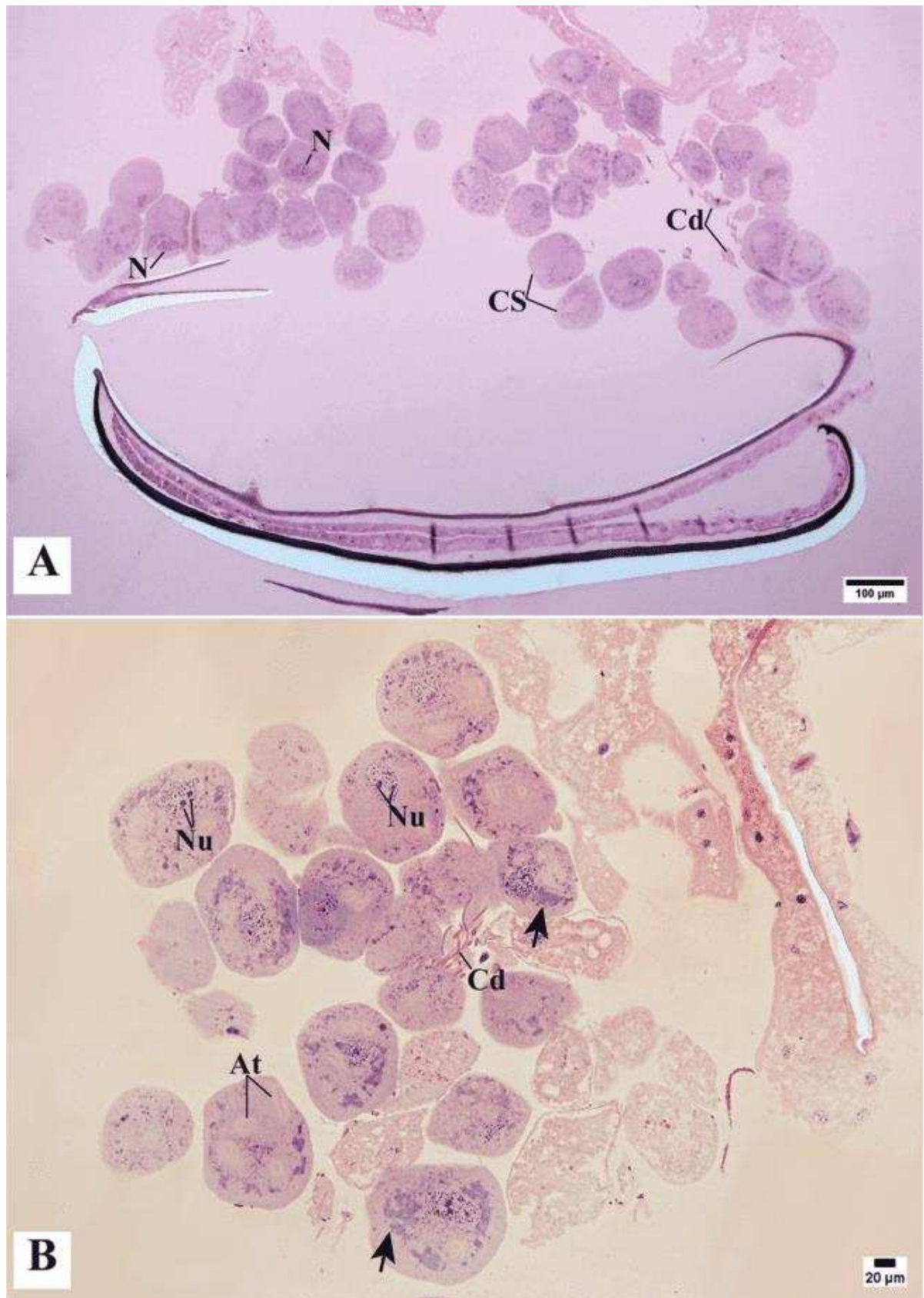


Figura 4. Micrografias de luz da glândula pré-faríngea de *Pachycodyla crassinoda*. **A.** Glândula pré-faríngea com as células secretoras (CS) evidenciando núcleos (N) e células ducto (Cd). **B.** Células secretoras com nucléolos (Nu) e citoplasma com grânulos basófilos (setas). Notar aparato terminal (At).

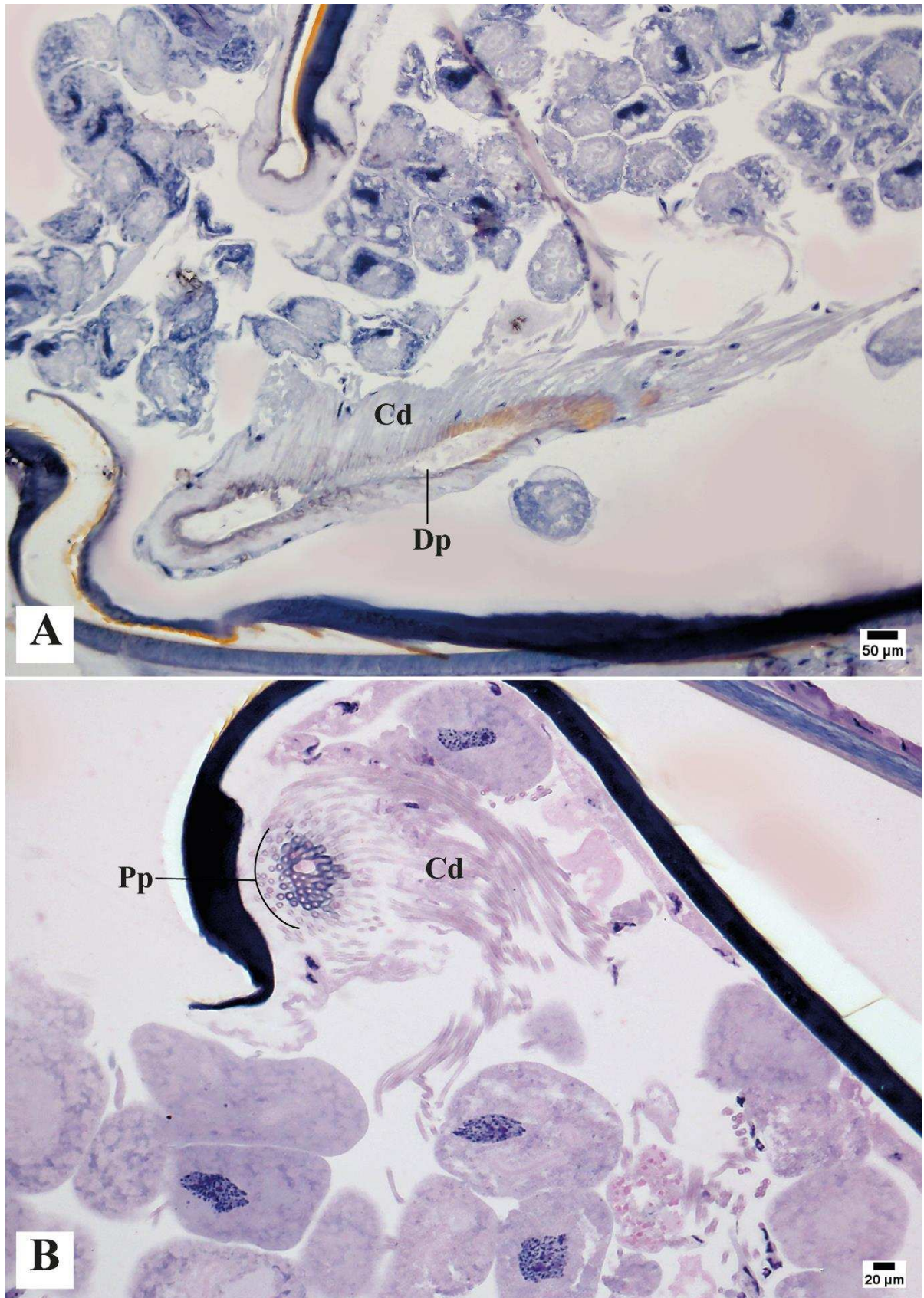


Figura 5. Micrografias de luz da glândula pré-faríngea. **A.** Corte longitudinal mostrando as células ducto (Cd) e sua conexão no ducto principal (Dp) em *Paraponera clavata*. **B.** Detalhe da placa crivada (Pp) onde se abrem as células ducto (Cd) em *Pachycondyla crassinoda*.

A morfometria revelou que as glândulas pré-faríngeas têm volumes diferentes, sendo maior em *P. clavata* que em *P. crassinoda* ($p = 0,03$; Fig. 6A), o que está relacionado com o maior tamanho da cabeça em *P. clavata*, mas não em *P. crassinoda* (Fig. 6B).

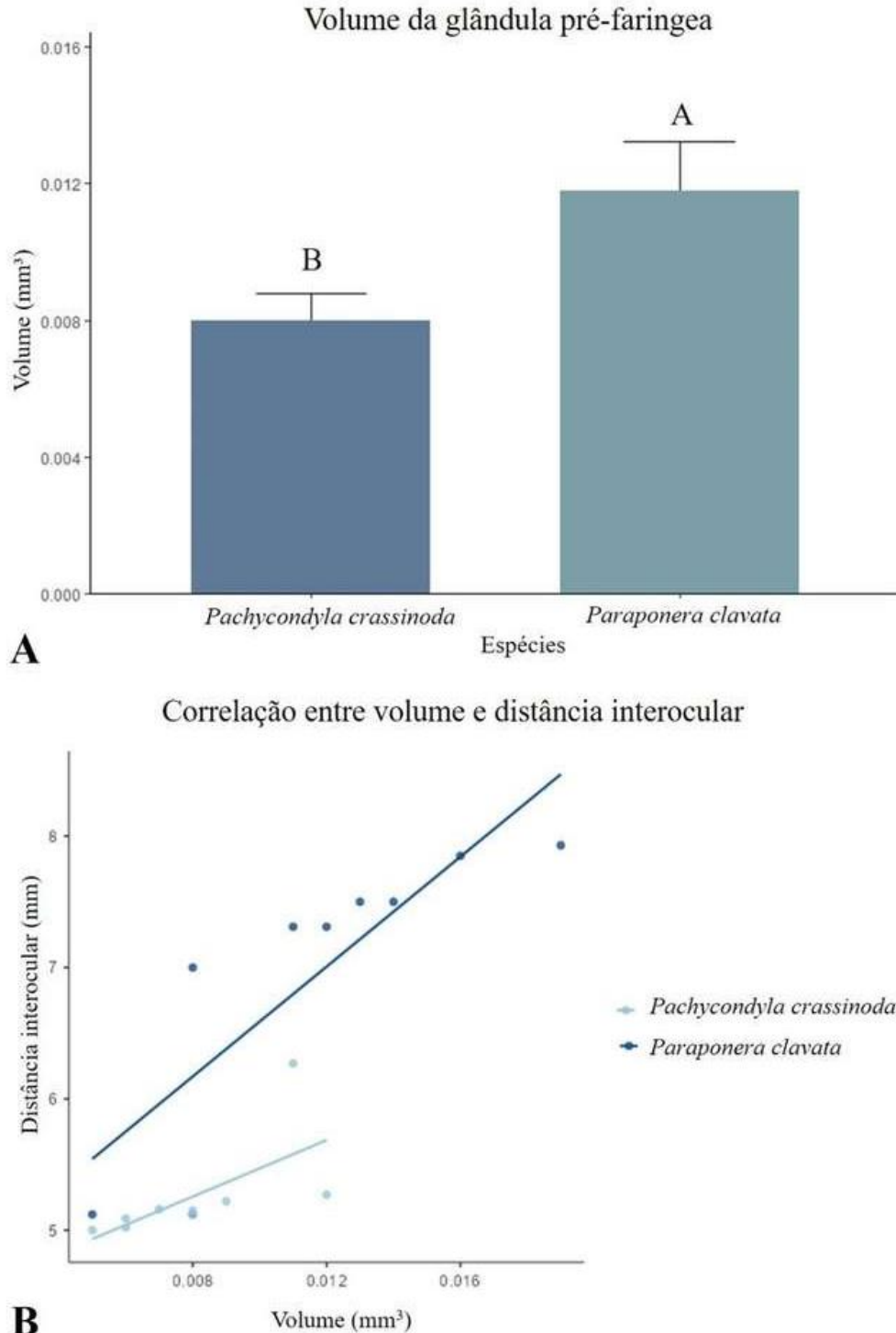


Figura 6. Morfometria da glândula pré-faríngea em *Pachycondyla crassinoda* e *Paraponera clavata* **A.** Volume total da glândula. **B.** Regressão linear mostrando correlação significativa e positiva entre volume da glândula e tamanho da cabeça em *P. clavata* ($p < 0,004$) e sem correlação em *P. crassinoda* ($p > 0,06$). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença pelo teste do Bonferroni ($p < 0,05$).

3.1.3 Histoquímica

O teste de mercúrio de bromofenol para detecção de proteínas totais, revelou forte reação positiva na glândula pré-faríngea, similar em ambas as espécies ($p > 0,4$; Fig. 7A).

O teste de ácido periódico de Schiff (PAS) para a detecção de glicoproteínas e carboidratos neutros, revelou reação positiva mais intensa na glândula pré-faríngea de *P. clavata* que em *P. crassinoda* ($p < 0,008$; Fig. 7B).

O teste com azul de Nilo, utilizado para evidenciar lipídeos neutros nas células, apresentou maior intensidade de reação em *P. crassinoda* que em *P. clavata* ($p < 0,004$; Fig. 7C).

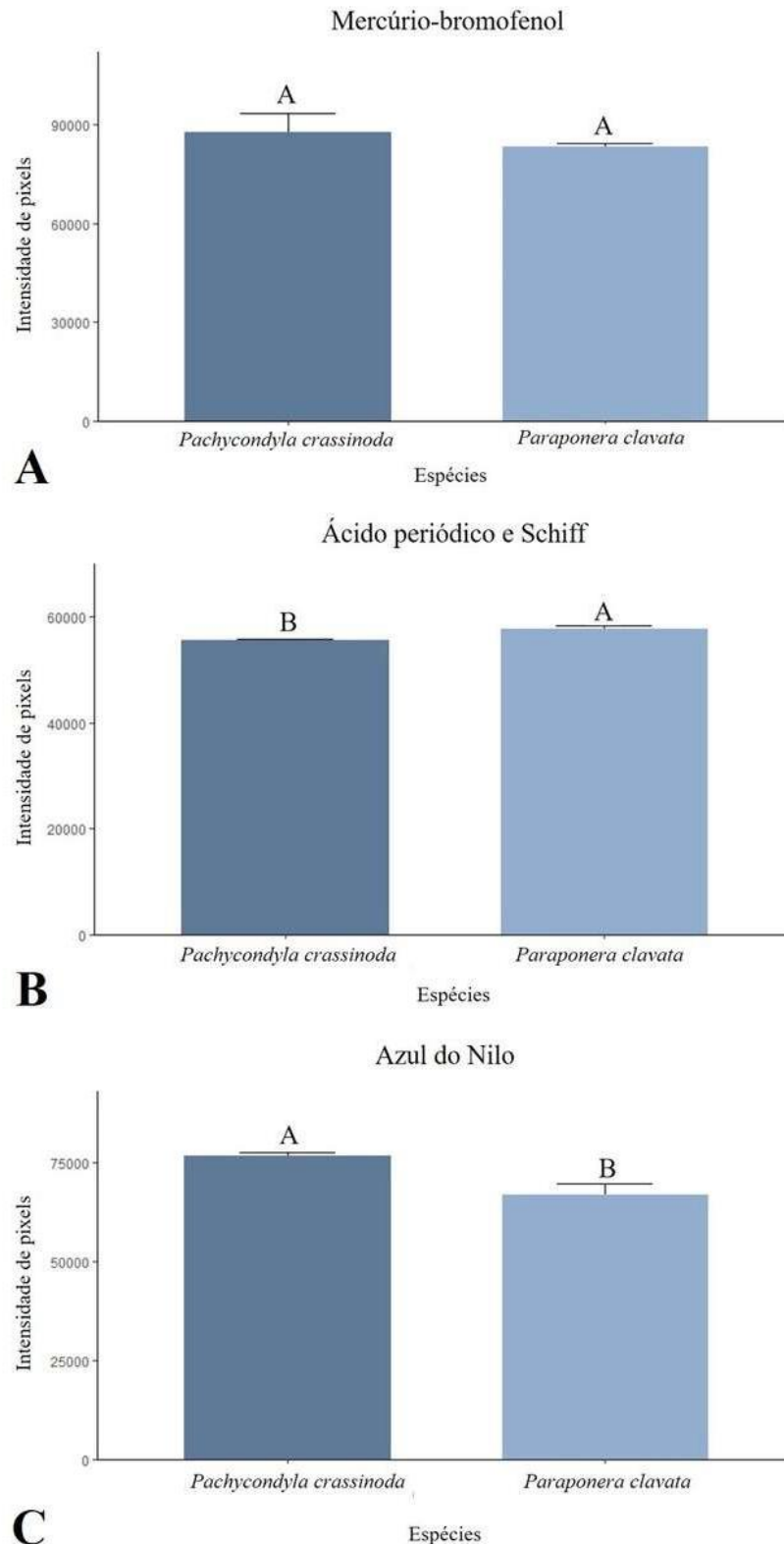


Figura 7. Intensidade de reações positivas para os testes histoquímicos nas glândulas pré-faríngeas de *Pachycondyla crassinoda* e *Paraponera clavata*. **A.** Mercúrio-bromofenol para proteínas totais. **B.** Ácido periódico e Schiff, para polissacarídeos neutros. **C.** Azul do Nilo para lipídeos neutros e ácidos. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença pelo teste do Bonferroni ($p < 0,05$).

3.2 Glândula faríngea

3.2.1 Anatomia

Em ambas as espécies analisadas a glândula faríngea foi encontrada na região ventral da cabeça, acima do cérebro. Estas glândulas estavam ligadas dorso-lateralmente à região posterior da faringe, logo após a porção terminal da placa hipofaríngea, onde bifurcaram-se, após um curto ducto, formando estruturas pares de cada lado no final da faringe.

Em *P. clavata*, a glândula faríngea apresentou projeções tubulares alongadas, algumas ramificadas (Fig. 8A, B). As projeções apresentaram $1,8 \pm 0,07$ mm de largura e $2,8 \pm 0,11$ mm de comprimento (Fig. 8A). A análise por microscopia eletrônica de varredura revelou que o epitélio que reveste a glândula faríngea de *P. clavata* exibe áreas lisas intercaladas com superfícies rugosas, sendo que cada protuberância corresponde à região basal de uma célula secretora (Fig. 8C).

Em *P. crassinoda* a glândula faríngea apresentou dois lóbulos conectados entre si (Fig. 9-A, B), com largura de $0,7 \pm 0,06$ mm e comprimento de $3,3 \pm 0,29$ mm. Estas glândulas foram subdivididas em uma região superior e outra inferior, com a região inferior se estendendo dorsalmente sobre o cérebro, enquanto a região superior se projeta lateralmente em direção às bordas ventrais dos olhos compostos. A análise por microscopia eletrônica de varredura evidenciou que o epitélio que reveste a glândula faríngea em *P. crassinoda* apresentou diferenças na superfície apical interna e externa. Na superfície externa da glândula o epitélio era liso com poucas protuberâncias, enquanto a região interna apresentou projeções alinhadas, semelhantes a escamas, sugerindo ser uma região recoberta por uma cutícula apical (Fig. 10A, B).

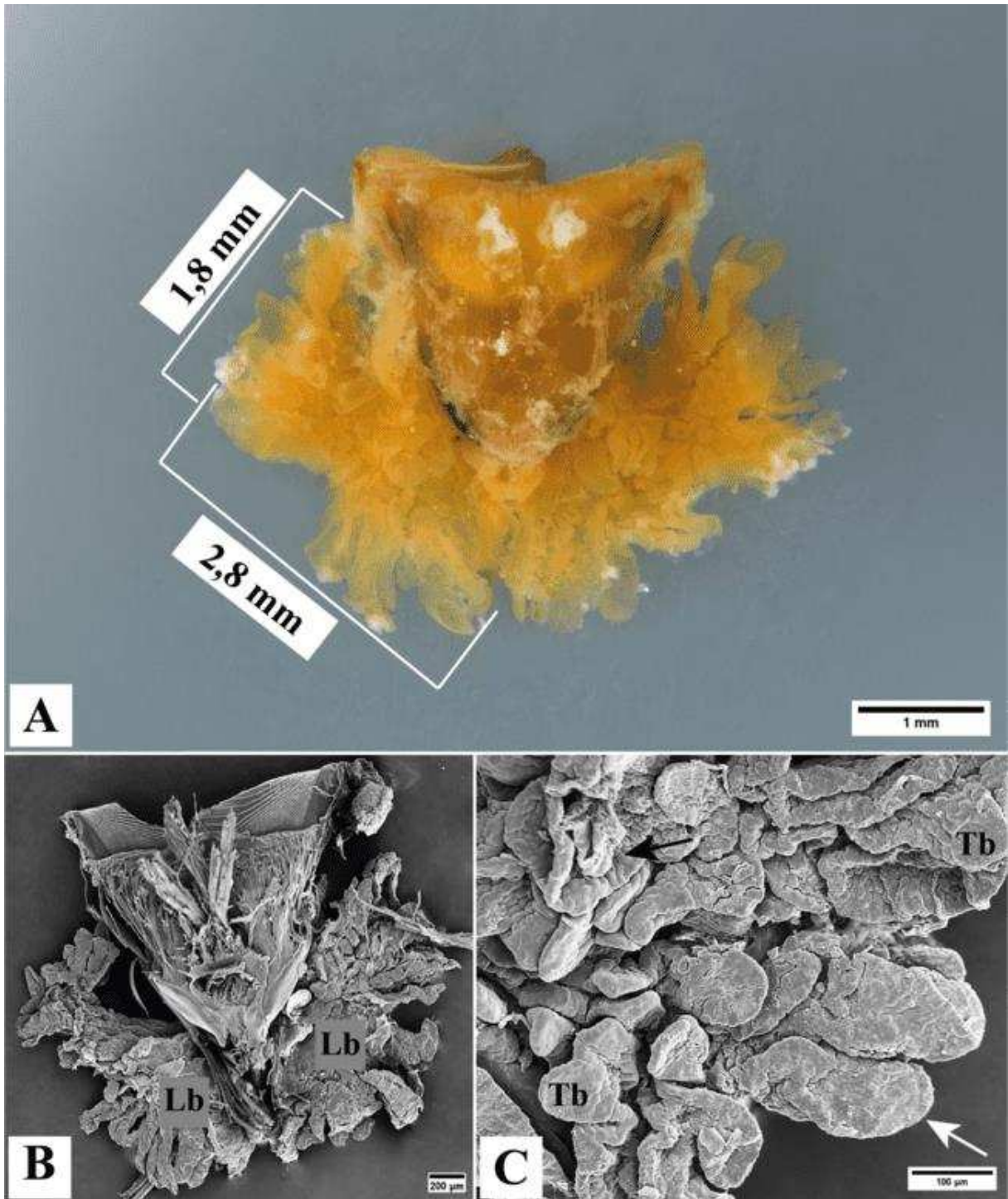


Figura 8. Glândulas faríngeas de operárias de *Paraponera clavata*. **A.** Vista dorsal da glândula faríngea (GF) em estereomicroscópio. **B.** Micrografia eletrônica de varredura da glândula faríngea mostrando os dois lóbulos (LB). **C.** Micrografia eletrônica de varredura evidenciando as projeções tubulares (Tb) da glândula faríngea com regiões lisas (seta branca) e rugosas (seta preta).

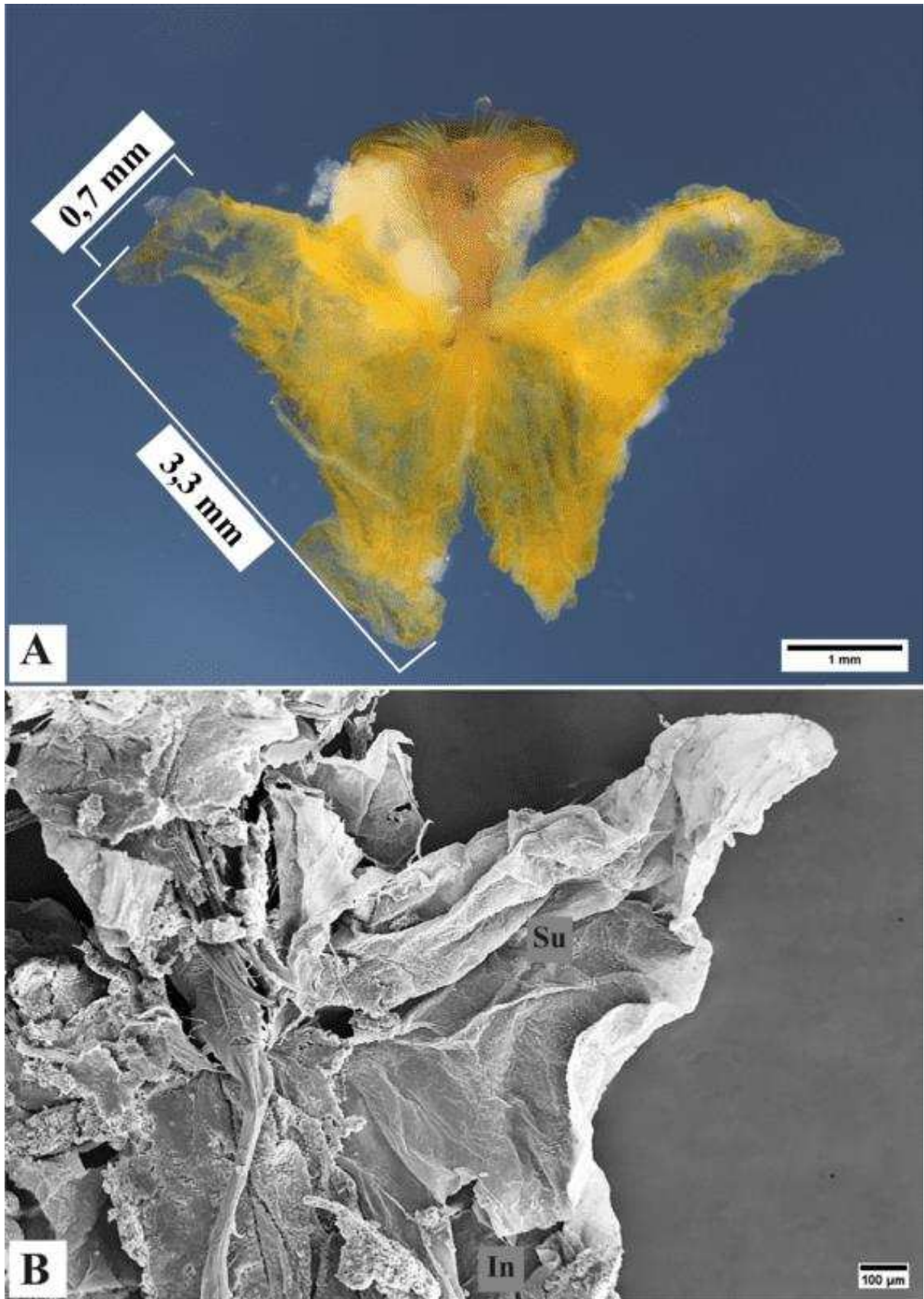


Figura 9. Glândulas faríngeas de operárias de *Pachycondyla crassinoda*. **A.** Vista dorsal da glândula faríngea em estereomicroscópio. **B.** Micrografia eletrônica de varredura da glândula faríngea com regiões inferiores (In) e superiores (Su).

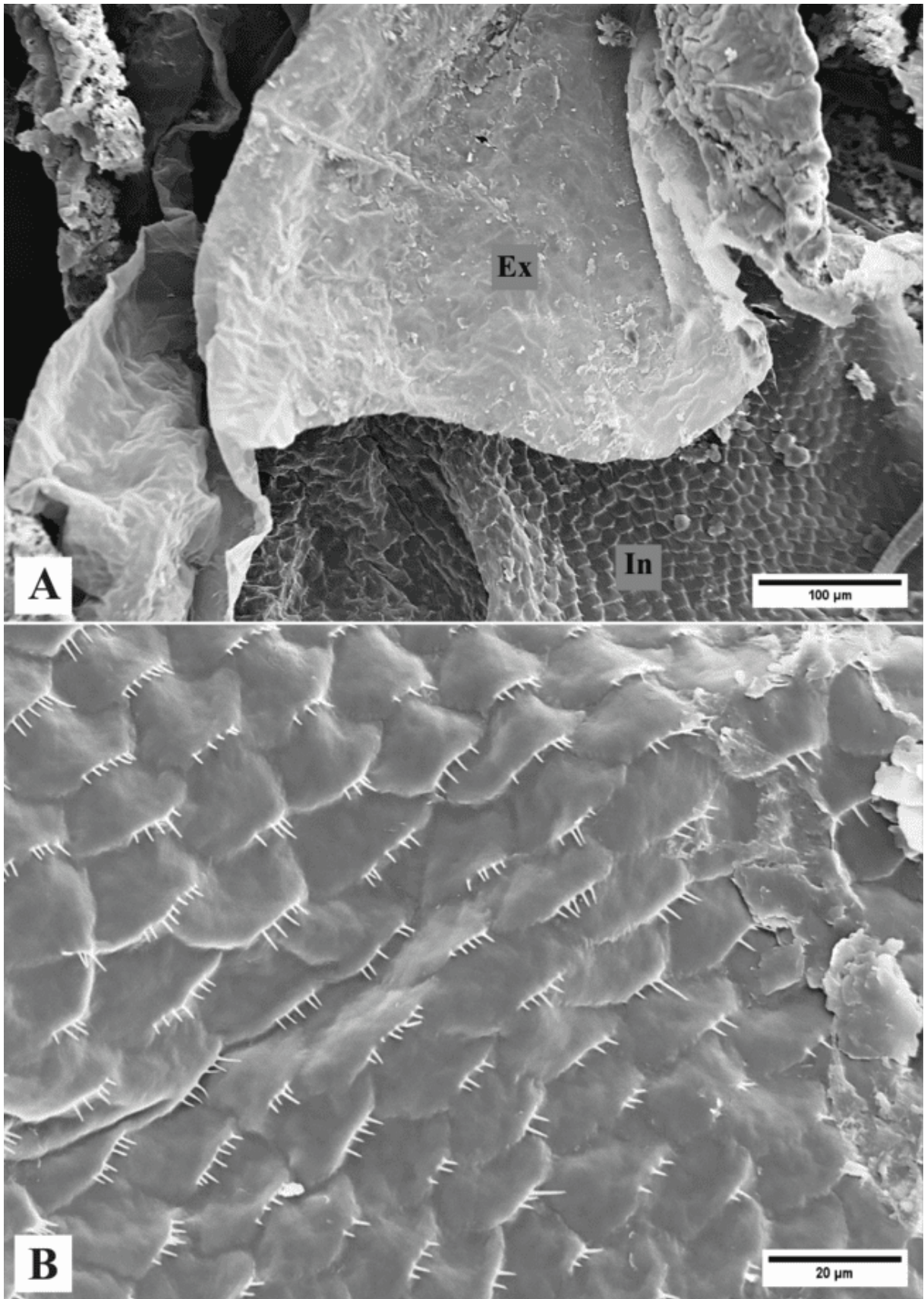


Figura 10. Micrografias eletrônicas de varredura das glândulas faríngeas em operárias de *Pachycondyla crassinoda*. **A.** Região externa (Ex) com superfície lisa e a região interior (In) com projeções cuticulares. **B.** Projeções cuticulares das glândulas faríngeas.

3.2.2 Histologia

Apesar da anatomia diferenciada das glândulas faríngeas, com *P. crassinoda* exibindo uma glândula lobada volumosa e *P. clavata* apresentando uma glândula composta por múltiplas projeções, em ambas as espécies elas são formadas por uma camada única de epitélio.

As projeções digitiformes da glândula faríngea de *P. clavata* apresentaram epitélio com altura de $49,95 \pm 1.84 \mu\text{m}$, caracterizadas por células cúbicas com núcleo majoritariamente com cromatina condensada e nucléolos evidentes (Fig. 11A). O citoplasma foi rico em grânulos acidófilos (Fig. 11B). O lúmen da glândula faríngea apresentou diâmetro de $14,93 \pm 0.74 \mu\text{m}$ e revestido por cutícula (Fig. 11B).

Na glândula de *P. crassinoda*, o epitélio foi caracterizado por células altas ($70,21 \pm 5.52 \mu\text{m}$), contendo núcleos com cromatina descondensada e nucléolos evidentes (Fig. 12A). No citoplasma dessas células, ocorreram vesículas transparentes e grânulos acidófilos (Fig. 12B). O lúmen da glândula apresentou diâmetro de $18,12 \pm 2.61 \mu\text{m}$, sendo revestido por uma fina camada de cutícula (Fig. 12B). A análise estatística revelou que o epitélio da glândula faríngea de *P. crassinoda* é 19 vezes mais espesso que em *P. clavata* ($p = 0,004$), mas com os lúmens apresentando diâmetros semelhantes ($p = 0,25$).

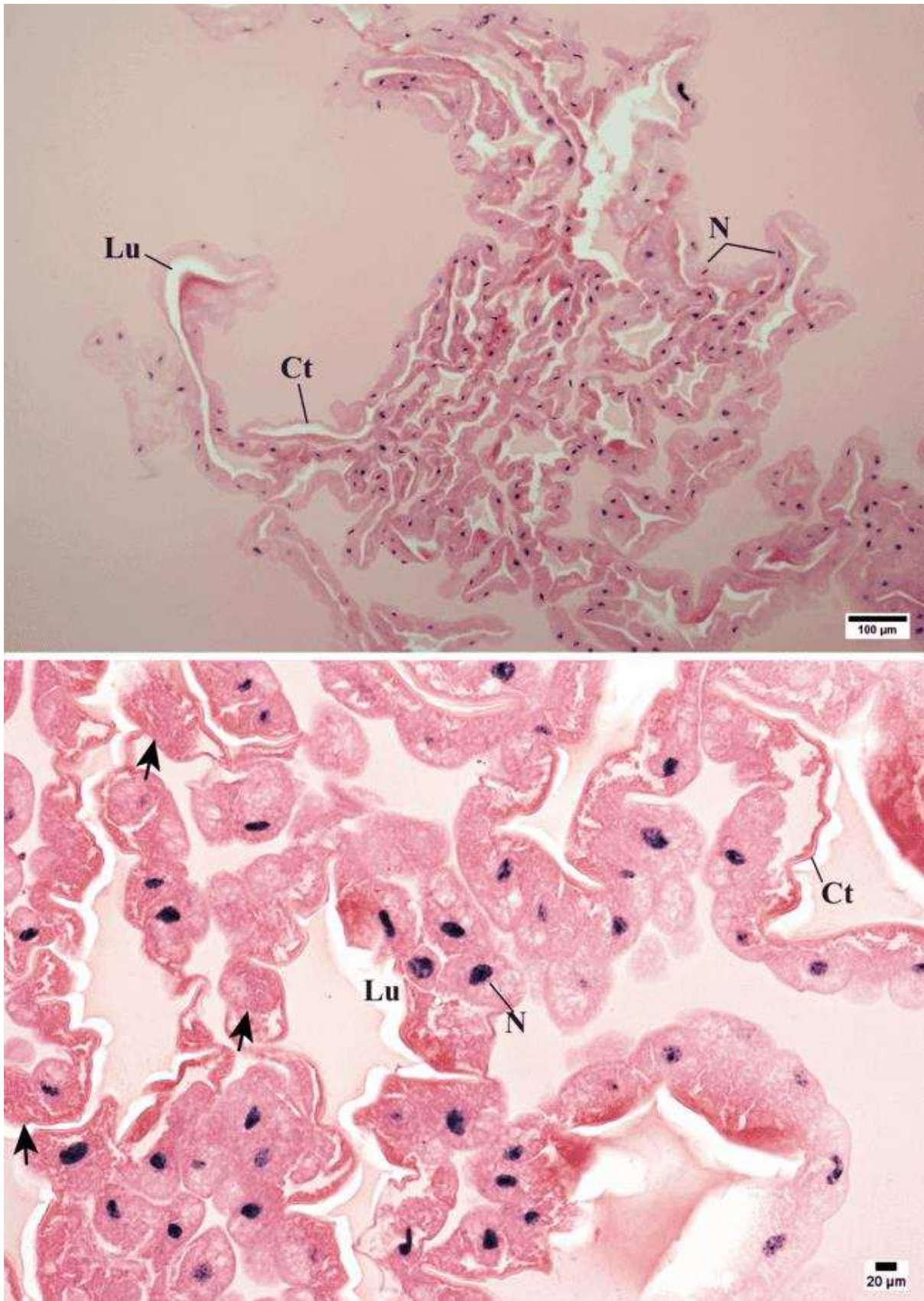


Figura 11. Micrografias de luz da glândula faríngea de *Paraponera clavata*. **A.** Cortes longitudinais evidenciando o epitélio revestido por cutícula (Ct) delimitando o lúmen (Lu). **B.** Detalhe do epitélio cúbico evidenciando o núcleo (N) condensado, citoplasma com grânulos acidófilos (setas) e lúmen (Lu) com uma camada de cutícula (Ct).



Figura 12. Micrografias de luz da glândula faríngea em *Pachycondyla crassinoda*. **A.** Epitélio delimitando o lúmen. **B.** Detalhe do epitélio evidenciando núcleos (N) com cromatina descondensada, nucléolos (Nu), e citoplasma com vesículas (ve) e grânulos eosinófilos (seta). Notara a cutícula (Ct) revestindo o epitélio.

3.2.3 Histoquímica

A análise histoquímica de mercúrio de bromofenol para a detecção proteínas totais, evidenciou que as glândulas faríngeas apresentaram forte reação positiva similares em ambas as espécies ($p = 0,41$; Fig. 13A).

A detecção de glicoproteínas e carboidratos neutros pelo teste PAS revelou fraca reação positiva, semelhante nas glândulas faríngeas de *P. clavata* e *P. crassinoda* ($p = 0,87$; Fig. 13B), enquanto a histoquímica com azul de Nilo para a detecção de lipídeos neutros, apresentou reação positiva mais intensa nas células da glândula faríngea de *P. crassinoda* que em *P. clavata* ($p < 0,001$; Fig. 13C).

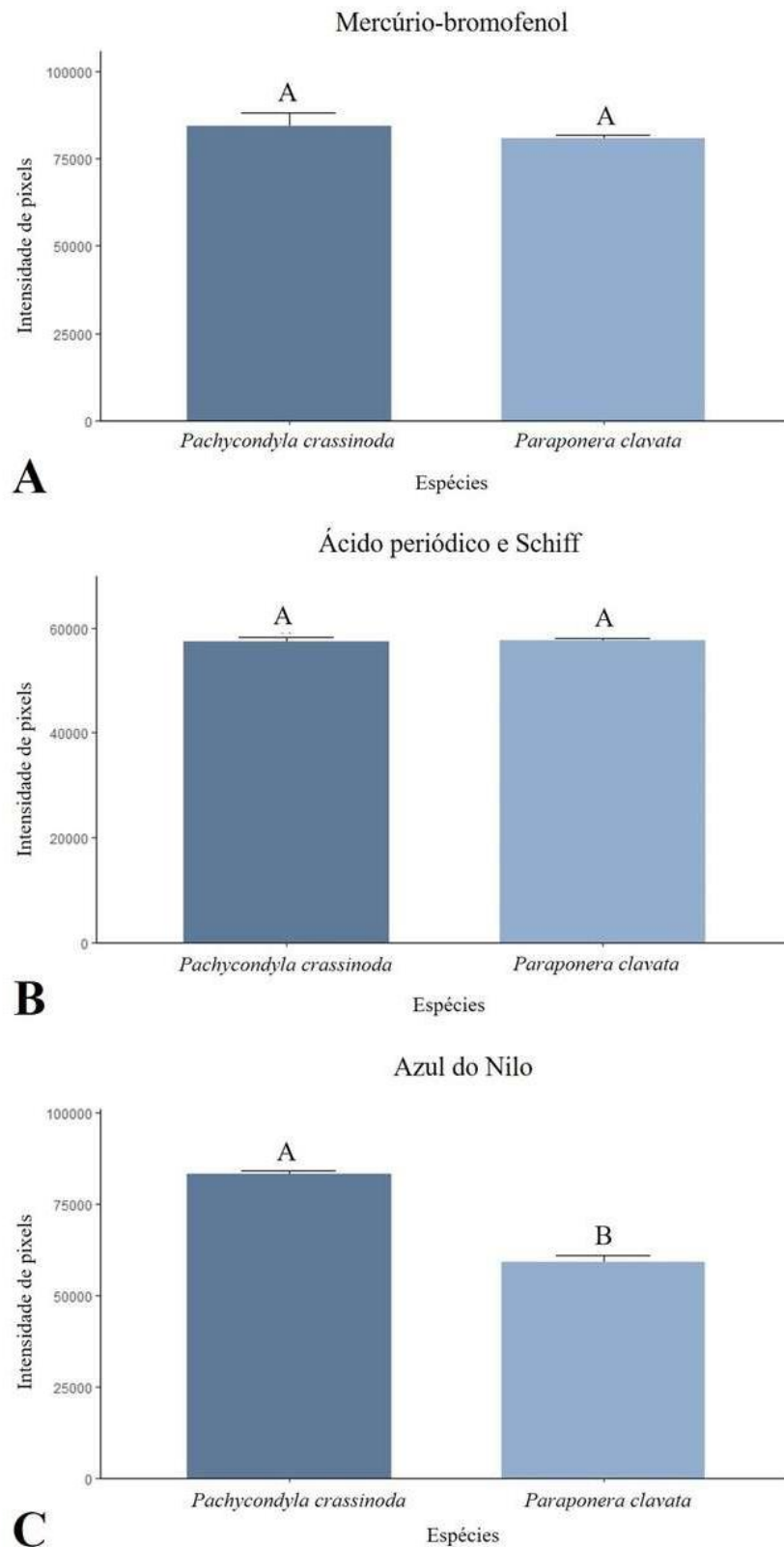


Figura 13. Intensidade de reações positivas para os testes histoquímicos nas glândulas faríngeas de *Pachycondyla crassinoda* e *Paraponera clavata*. **A.** Mercúrio-bromofenol para proteínas totais. **B.** Ácido periódico e Schiff, para polissacarídeos neutros. **C.** Azul do Nilo para lipídeos neutros e ácidos. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença pelo teste do Bonferroni ($p < 0,05$).

3.3 Cromatografia em fase gasosa acoplada com espectroscopia de massas

A análise dos componentes químicos das glândulas pré-faríngeas e faríngeas evidenciou a presença de 36 compostos para *P. clavata* com comprimentos de cadeia de 12 a 36 átomos de carbono (Tabela 1), dos quais 15 foram classificados como Não Identificados (NI), devido à baixa similaridade observada entre os espectros de massas dos compostos e aqueles presentes nas bibliotecas de referência. Para *P. crassinoda* foram detectados 29 compostos com comprimentos de cadeia de 14 a 34 átomos de carbono, dos quais 11 foram categorizados como NI e 12 foram comuns às duas espécies (Tabela 2). O perfil químico das amostras foi dominado quase que predominantemente por hidrocarbonetos alcanos (tanto ramificados quanto não ramificados), com uma presença limitada de alcenos, alcadieno, álcoois (saturados e insaturados), álcoois graxos, grupo acetato, amida, cetona e éter cíclico.

Em *P. clavata*, os compostos exclusivos de maior abundância foram os NIs; Trifluoroacetato de hexacosil; Colestan-3-ona, 1,2-etanodiil acetal cíclico, (5alfa)- e 2,3,4,5,6,7-Hexahidro-3,6-diciclohexil-10,11-difenil-bis-[1,3]-oxazino[6,5-f:5',6'-H] quinoxalina (Tabela 1). Os compostos compartilhados com maior abundância entre as espécies foram Docosano, 7-butil-; Docosano, 7-hexil-; Docosano, 11-butil-; Eicosano, 7-hexil-; Octacosano; Eicosano, 10-metil-; Heptadecano, 9-octil- e 1-Pentadeceno (Tabelas 1 e 2). Enquanto os compostos exclusivos para *P. crassinoda* que se destacaram foram 1-Eicosanol e Docosano, 2,21-dimetil (Tabela 2).

Tabela 1. Composição química das glândulas pré-faríngea e faríngeas de operárias da formiga *Paraponera clavata*, (n=5), com o tempo de retenção (TR)), porcentagem de massa (%A), porcentagem de similaridade (%S). Compostos em cinza estão presentes nas duas espécies. “*” são hidrocarbonetos ramificados.

Compostos	TR	%A	%S	Grupo funcional	Fórmula molecular
Colestan-3-ona, 1,2-etanodiil acetal cíclico, (5alfa)-	22.250	35.48	63%	Cetona e éter cíclico	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
Docosano, 7-butil-*	19.757	13.30	95%	Alcano ramificado	C ₂₆ H ₅₄
Docosano, 11-butil-*	20.514	10.99	94%	Alcano ramificado	C ₂₆ H ₅₄
Docosano, 7-hexil-*	21.386	12.62	92%	Alcano ramificado	C ₂₈ H ₅₈
Eicosano, 7-hexil-*	19.104	12.59	95%	Alcano ramificado	C ₂₆ H ₅₄
Eicosano, 2-metil-*	17.507	7.96	95%	Alcano ramificado	C ₂₁ H ₄₄
Eicosano, 10-metil-*	17.999	8.25	93%	Alcano ramificado	C ₂₁ H ₄₄
Heneicosano, 11-(1-etilpropil)-*	22.450	2.21	93%	Alcano ramificado	C ₂₆ H ₅₄
Heptadecano, 9-octil-*	18.526	8.08	95%	Alcano ramificado	C ₂₅ H ₅₂
Trifluoroacetato de hexacosil	24.622	64.52	79%	Grupo acetato	C ₂₈ H ₅₃ F ₃ O ₂
n-Hexiatriacontano	22.430	11.58	92%	Alcano	C ₃₆ H ₇₄
NI	22.249	2.92			
NI	24.603	3.66			
NI	25.201	5.89			
NI	29.257	3.39			
NI	22.432	3.14			
NI	24.710	5.04			
NI	24.916	7.57			
NI	16.714	4.69			
NI	19.100	6.53			
NI	20.083	1.89			
NI	22.229	6.42			
Nonadecano, 2-metil-*	17.032	5.05	91%	Alcano	C ₂₀ H ₄₂
Octacosano	20.503	14.12	93%	Alcano	C ₂₈ H ₅₈
Propanamida, N-(4-metoxifenil)-2,2-dimetil-	25.170	4.63		Amida	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂

Tabela 1. continuação

Tetracosano	17.502	2.11	90%	Alcano	C ₂₄ H ₅₀
Tetracosano, 11-decil-*	23.697	7.22	90%	Alcano ramificado	C ₃₄ H ₇₀
Tricosano, 2-metil-	18.529	7.07	94%	Alcano ramificado	C ₂₄ H ₅₀
1-Docoseno	17.502	2.11	94%	Alcano	C ₂₂ H ₄₄
1-Pentadeceno	16.932	4.11	92%	Alceno	C ₁₅ H ₃₀
1-Octanol, 2-butil-	16.557	1.26	90%	Álcool graxo	C ₁₂ H ₂₆ O
1,15-Pentadecanodiol	22.094	1.17	91%	Álcool	C ₁₅ H ₃₂ O ₂
1,19-Eicosadieno	23.276	2.45	92%	Alcadieno	C ₂₀ H ₃₈
2,3,4,5,6,7-Hexahidro-3,6-diciclohexil-10,11-difenil-bis-[1,3]-oxazino[6,5-f:5',6'-H]quinoxalina	22.297	20.39	67%		C ₃₆ H ₄₀ N ₄ O ₂
17-Pentatriaconteno	23.449	3.69	94%	Alcano	C ₃₅ H ₇₀
18-Nonadecen-1-ol	24.787	4.59	90%	Álcool insaturado	C ₁₉ H ₃₈ O

NI – Não identificado

Tabela 2. Composição química das glândulas pré-faríngeas e faríngeas de operárias da formiga *Pachycondyla crassinoda*, (n=5), com o tempo de retenção (TR), porcentagem de massa (%A), porcentagem de similaridade (%S). Compostos em cinza estão presentes nas duas espécies. “*” são hidrocarbonetos ramificados.

Compostos	TR	%A	%s	Grupo funcional	Fórmula molecular
Decano, 2,3,5,8-tetrametil-*	12.831	2.63	91%	Alcano ramificado	C ₁₄ H ₃₀
Docosano, 2,21-dimetil-*	19.104	13.29	93%	Alcano ramificado	C ₂₄ H ₅₀
Docosano, 7-butil-*	19.756	14.25	95%	Alcano ramificado	C ₂₆ H ₅₄
Docosano, 7-hexil-*	21.384	11.09	93%	Alcano ramificado	C ₂₈ H ₅₈
Docosano, 11-butil-*	20.505	13.61	94%	Alcano ramificado	C ₂₆ H ₅₄
Dodecano, 2,6,11-trimetil-	13.924	5.65	90%	Alcano ramificado	C ₁₅ H ₃₂
Eicosano, 2-metil-*	17.506	6.81	95%	Alcano ramificado	C ₂₁ H ₄₄
Eicosano, 3-metil-*	18.002	2.74	92%	Alcano ramificado	C ₂₁ H ₄₄
Eicosano, 7-hexil-*	19.107	3.64	93%	Alcano ramificado	C ₂₆ H ₅₄
Eicosano, 10-metil-*	17.998	10.16	95%	Alcano ramificado	C ₂₁ H ₄₄
Heptadecano, 9-octil-*	18.525	11.83	94%	Alcano ramificado	C ₂₅ H ₄₂
NI	16.562	1.28			
NI	17.899	2.19			
NI	23.690	2.45			
NI	11.058	9.92			
NI	12.523	8.70			
NI	12.823	6.82			
NI	14.182	3.97			
NI	16.056	2.19			
NI	16.492	8.89			
NI	16.706	5.52			
NI	12.526	3.88			
n-Pentadecano	13.932	2.73	91%	Alcano	C ₁₅ H ₃₂
Nonadecano, 2-metil-*	17.035	7.31	96%	Alcano ramificado	C ₂₀ H ₄₂
Octacosano	21.390	3.40	93%	Alcano	C ₂₈ H ₅₈
Tetradecano	16.067	5.34	95%	Alcano	C ₁₄ H ₃₀
Tetracosano, 11-decil-*	23.674	5.99	91%	Alcano ramificado	C ₃₄ H ₇₀
1-Eicosanol	16.943	58.53	95%	Álcool graxo	C ₂₀ H ₄₂ O

Tabela 2. continuação

1-Pentadeceno	16.924	44.78	94%	Alceno	$C_{15}H_{30}$
---------------	--------	-------	-----	--------	----------------

NI – Não identificado

4. DISCUSSÃO

4.1 Glândula pré-faríngea

A glândula pré-faríngea em *P. clavata* e *P. crassinoda* é constituída por unidades bicelulares compostas de uma célula secretora acompanhada de uma célula ducto, características típicas das células glandulares do tipo III (Noirot & Quennedey, 1974). A morfologia e histologia da glândula pré-faríngea descrita aqui para ambas as espécies, sendo formada por um aglomerado de células de ambos os lados da placa faríngeal é comum para outras espécies de formiga como Formicinae *Camponotus japonicus* (Mayr, 1866) (Xu et al., 2022), *Lasius niger* (Linnaeus, 1758) (Niculita et al., 2007), Ectoninae *Monomorium pharaonis* (Linnaeus, 1758) (Boonen e Billen, 2016) e Leptaniilinae *Protanilla wallacei* (Griebenow, 2024) (Billen et al., 2013), indicando uma possível sinapomorfia para Formicidae.

O volume da glândula pré-faríngea em *P. clavata* está correlacionado com o tamanho corporal do indivíduo, onde foi estabelecida uma relação entre o volume da glândula e a distância interocular. Em *P. crassinoda*, essa correlação não foi observada. *Paraponera clavata* apresenta volume glandular maior, com um maior número de células secretoras e células ductos mais largas. No entanto, mesmo com um volume menor, as células secretoras na glândula pré-faríngea de *P. crassinoda* são maiores, sugerindo que o modo de ação da glândula pode variar entre as duas espécies.

Embora a função das glândulas pré-faríngeas não esteja completamente elucidada, é geralmente associada à produção de enzimas digestivas ou trofalaxia, devido a sua associação com abertura na placa faríngea (Amaral e Caetano, 2005; Billen et al., 2013). No entanto, a trofalaxia não ocorre entre adultos ou entre adultos e larvas em Ponerinae e Paraponerinae, com exceção de *Hypoponera* (Santschi, 1938) (Schmidt & Shattuck, 2014) indicando que a ação dessa glândula nas formigas estudadas provavelmente está mais relacionada à produção de enzimas digestivas do que à trofalaxia. Ambas as espécies são onívoras, com *P. clavata* sendo principalmente predadora oportunista, podendo alimentar-se desde artrópodes menores (Dyer, 2002; Tillberg & Breed, 2004), até pequenos vertebrados (Fritz et al., 1981, Delsinne et al., 2019), além de se alimentarem de néctar e outras secreções de plantas (Holldobler e Wilson, 1990). A dieta de *P. crassinoda* consiste principalmente de uma variedade de artrópodes, incluindo insetos de corpo mole, térmitas e miriápodes, além de se alimentarem oportunamente de outros recursos disponíveis, como frutas caídas (Overal, 1987; Longino, 2014). Portanto, as divergências observadas nos volumes glandulares e no tamanho celular, possivelmente estão relacionados às necessidades individuais específicas de alimentação e digestão entre as duas espécies.

Dessa forma é possível supor que devido à alimentação de presas maiores, que possuem uma composição nutricional mais complexa, *P. clavata* pode necessitar de uma ampla variedade de enzimas digestivas para processar esses alimentos. Essa hipótese pode explicar o volume glandular maior em *P. clavata* em relação a *P. crassinoda*, pois a secreção de substâncias químicas pelas glândulas exócrinas do tipo III, pode resultar tanto no aumento do volume quanto no tamanho e número de células secretoras nas glândulas (Cruz Landim & Costa, 1998). Além disso, essa hipótese pode explicar a predominância de grânulos basófilos no citoplasma, núcleos e nucléolos mais desenvolvidos nas células secretoras de *P. clavata*, indicando que as células estão em alta síntese proteica e em intensa atividade metabólica.

O modo de abertura da glândula pré-faríngea relatado para *P. crassinoda*, onde se observa que os ductos se unem em uma placa crivada é uma característica observada para a glândula pré-faríngea em Myrmicinae *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) (Amaral e Caetano, 2005) e *P. sennaarensis* (Billen e Al-Khalifa, 2015) que foi posteriormente reclassificada para o gênero *Brachyponera*, agora sendo denominada *Brachyponera sennaarensis*. No entanto, o padrão de abertura observado em *P. clavata*, caracterizado por um complexo sistema de ductos, foi uma característica descrita apenas em *C. japonicus* (Xu et al., 2022), que assim como a glândula pré-faríngea de *P. clavata* também possui um grande volume glandular. Isso sugere que quando maior o volume glandular, maior será a produção e liberação de compostos da glândula, exigindo assim um aparato mais complexo de células ductos que permita a conexão de todas as células à faringe (Xu et al. 2022). Essa característica pode explicar o tipo de abertura encontrado em *P. crassinoda*, que devido ao menor número de células secretoras, a abertura em placa crivada é mais adequada para permitir a conexão de todas as células à faringe. Além disso, esses ductos alongados podem desempenhar uma função semelhante aos reservatórios glandulares (Xu et al. 2022), com o armazenamento temporário das secreções glandulares.

Os testes histoquímicos revelam que em ambas as espécies, a glândula pré-faríngea é rica em proteínas, evidenciando uma possível função enzimática. Além disso, foram identificados glicoproteínas e polissacarídeos nas células secretoras, similar ao encontrado em *A. sexdens rubropilosa* (Amaral e Caetano 2005). Contudo, a quantidade desses compostos foi maior em *P. clavata* que em *P. crassinoda*, o que pode estar relacionado a uma maior produção de glicoproteínas por esta formiga, possivelmente enzimas. A glândula pré-faríngea de *P. clavata* parece ser mais ativa na produção e secreção de suas enzimas digestivas em comparação com *P. crassinoda* o que pode estar intimamente relacionada às diferenças em sua alimentação. *P. clavata*, como mencionado anteriormente, possui uma dieta mais diversificada

e potencialmente mais complexa, incluindo grandes presas e de néctar extrafloral (Janzen e Carroll, 1991; Hossaert-Mckey et al., 2001; Davidson et al., 2004), enquanto *P. crassinoda* se alimenta principalmente de térmitas e miriápodes (Overal, 1987). Esta distinção alimentar pode explicar também a maior concentração de lipídeos observados no teste de azul de Nilo na glândula pré-faríngea de *P. crassinoda*, devido a dieta desta espécie ser mais rica em lipídeos quando comparadas à de *P. clavata*.

A partir destes resultados, podemos sugerir que em ambas as espécies, a glândula pré-faríngea desempenha uma função na produção de proteínas, possivelmente enzimas digestivas adequadas qualitativa e quantitativamente as dietas e necessidades de cada uma das espécies.

4.2 Glândula faríngea

A glândula faríngea apresenta morfologia distinta entre as diferentes espécies de formigas, sendo *P. clavata*, com vários prolongamentos em forma de digitiformes, mais comumente encontrada em formigas, como Leptanillinae *P. wallacei* (Billen et al., 2013), Myrmicinae *M. pharaonis* (Eelen et al., 2006), Formicinae *C. japonicus* (Xu et al., 2022) e *L. niger* (Nicolita et al., 2006) e Aneuritinae *Aneuretus simoni* (Emery, 1893) (Billen, 2017 Já em *P. crassinoda*, a morfologia é distinta, apresentando dois grandes lóbulos que se conectam na transição entre a faringe e o esôfago, uma característica rara, descrita apenas para *P. villosa* (Lucas et al., 2004) e anteriormente para *Brachyponera sennaarensis* (Billen e Al-Khalifa, 2015). Em ambas as espécies, a glândula faríngea está posicionada sobre o cérebro, no entanto essa característica pode variar entre as formigas, pois em *M. pharaonis* ela ocorre sob o cérebro (Eelen et al., 2006), possivelmente uma adaptação para otimizar a produção e liberação dos compostos produzidos.

Outra característica peculiar observada em *P. crassinoda* é a presença de uma série de projeções cuticulares na superfície apical interna da glândula faríngea, como relatado para *B. sennaarensis* (Billen e Al-Khalifa, 2015) e *P. villosa* (Jesus, 2012). Apesar da ocorrência de cutícula no lúmen da glândula ser uma característica desta glândula compartilhada com *Pachycondyla striata* (Smith, 1858) (Serrão et al., 2015), *C. japonius* (Xu et al., 2022) *M. pharaonis* (Eelen et al., 2006) e *B. sennaarensis* (Billen e Al-Khalifa, 2015), a ocorrência de projeções cuticulares parece ser uma novidade. ao aumento da superfície de secreção ou à facilitação do processo secretor (Eelen et al., 2006), mas, até o momento, sua função exata permanece desconhecida.

Além das diferenças anatômicas observadas, o epitélio da glândula faríngea de *P. crassinoda* é mais alto bem como o lúmen mais volumoso que aqueles de *P. clavata*, indicando uma maior taxa metabólica na primeira, que também apresenta células com núcleos ricos em

cromatina descondensada e nucléolos, além da presença de vesículas citoplasmáticas que estão ausentes em *P. clavata* assim como núcleos com predomínio de cromatina condensada. As diferenças entre a espessura do epitélio e o diâmetro do lúmen sugerem que, nessas espécies, as secreções são liberadas de forma controlada em diferentes quantidades.

A análise histoquímica revela alta quantidade de proteínas e glicoconjugados nas células secretoras de ambas as espécies, o que pode estar relacionado com a provável função da glândula na liberação de hidrocarbonetos para o reconhecimento de companheiras do ninho (Vienne et al., 1995; Lenoir et al., 2001), produzidos enzimaticamente pelo metabolismo de lipídios de reserva, que são importantes para a comunicação química e o reconhecimento social entre as formigas (Howard e Blomquist, 2005).

A detecção de lipídios na glândula faríngea era esperada, considerando que em *A. laevigata*, *C. vittatus* e *P. villosa*, lipídios ingeridos são armazenados nesta glândula (Jesus, 2012). Esse armazenamento de lipídios provavelmente é responsável pela coloração amarela da glândula em solução aquosa. Em *P. crassinoda* ocorre maior quantidade de lipídeos no epitélio da glândula faríngea que em *P. clavata*, provavelmente devido às diferenças na alimentação dessas formigas, sendo a dieta de *P. crassinoda* mais rica em lipídios. Os lipídeos presentes na glândula faríngea podem ser fontes para a produção e transporte de hidrocarbonetos da glândula, pois certos lipídios, como a lipoforina, podem transportar os hidrocarbonetos no seu núcleo hidrofóbico de alta densidade entre o corpo gorduroso e a glândula faríngea, para a produção um odor unificador da colônia (Lucas et al., 2004; Schal et al., 2001; Schal et al., 2003, Soroker & Hefetz, 2000).

4.3 Compostos químicos do complexo glandular pré-faríngea e faríngea

Tanto em *P. clavata* quanto em *P. crassinoda*, foram identificados 65 compostos nas glândulas pré-faríngeas e faríngeas, sendo 35 hidrocarbonetos com os saturados em maior abundância. A presença predominante dos hidrocarbonetos saturados também é descrita para o complexo glandular pré-faríngea e faríngea em Formicinae *Formica selysi* (Dondroit, 1918) e Myrmicinae *Manica rubida* (Latreille, 1802) (Hefetz et al., 1992) e *Solenopsis invicta* Buren, 1972 (Vander Meer et al., 1982). Este padrão indica que o complexo glandular em ambas as espécies é predominantemente formado por hidrocarbonetos, assim como para *Formica selysi* (Dondroit, 1918), *Camponotus lateralis* (Olivier, 1792), *Camponotus vagus* (Scopoli, 1763), *Manica rubida* (Latreille, 1802) (Bagnères e Morgan, 1991), *Atta colombica* (Guérin-Méneville, 1844), *Acromyrmex echinatio* (Forel, 1899) e *Sericomyrmex amabilis* (Wheeler, 1925) (Richard et al., 2007) demonstrando que a predominância destes compostos pode ser uma característica para Formicidae.

Na glândula faríngea de *P. clavata*, dos 18 hidrocarbonetos identificados, 17 são de cadeia longa, enquanto em *P. crassinoda* dos 17 hidrocarbonetos, 12 são de cadeia longa. Em insetos sociais os hidrocarbonetos de cadeia longa são associados a efeitos comportamentais como reconhecimentos de companheiras do ninho (Lucas et al., 2004), e a alta incidência desses compostos nas duas espécies aqui estudadas pode corroborar a hipótese de que a glândula faríngea atua no reconhecimento companheiras de ninho.

Hidrocarbonetos ramificados representam 9 compostos de *P. clavata* e 11 de *P. crassinoda*. A ramificação dos alcanos reduz significativamente sua temperatura de fusão, tornando esses compostos mais flexíveis (Gibbs, 1998). Assim, esses hidrocarbonetos são facilmente coletados na glândula faríngea e distribuídos novamente durante o alo-grooming e contatos físicos, o que sugere sua possível contribuição na comunicação química (Lucas et al., 2004; Soroker et al., 1994; Soroker et al., 2003).

Os componentes químicos com maior porcentagem de massa em *P. clavata* foram Trifluoroacetato de hexacosil, Colestan-3-ona, 1,2-etanodiil acetal cíclico, (5alfa)- e 2,3,4,5,6,7-Hexahidro-3,6-diciclohexil-10,11-difenil-bis-[1,3]-oxazino[6,5-f:5',6'-H] quinoxalina. Mas apesar das altas concentração em massa, esses compostos não demonstraram uma correspondência satisfatória com a biblioteca de referência. Portanto, o isolamento destes compostos do complexo glandular é essencial para uma identificação precisa e confiável. Outros compostos predominantes, exclusivos somente em *P. clavata* incluem o n-Hexatriacontano, descrito como um hidrocarboneto cuticular com potencial feromônio de contato no besouro Chrysomelidae *Zygogramma bicolorata* (Pallister, 1953) (Qadir et al., 2020), o Tricosano, 2-metil-, um hidrocarboneto cuticular encontrado em Diptera Sarcophagidae *Sarcophaga peregrina* (Robineau-Desvoidy, 1830) (Zhang X et al., 2022) e o Eicosano, 10-metil descrito como hidrocarboneto cuticular em cupins do gênero *Zootermopsis* (Emerson, 1933) (Haverty et al., 1988).

O composto predominantemente compartilhado em *P. clavata* e *P. crassinoda* é o Docosano, 7-butil. Este composto possui potencial para ser utilizado como matéria-prima de elevado valor agregado em formulações medicinais, cosméticas e solventes industriais (Zhang et al., 2011). Outros compostos compartilhados são o Docosano, 7-hexil-, identificado na secreção da glândula pigidial em besouros Carabidae, com potencial efeito anticancerígeno (Nenadi et al., 2018). O Heptadecano, 9-octil-, identificado no óleo das folhas de manaplanta *Alhagi maurorum* (Fabaceae) relatado por possuir efeito diurético (Samejo et al., 2012), além de ser encontrado na glândula metapleurale de *P. clavata* e *P. crassinoda* (Alves, 2023).

A presença de compostos fitoquímicos nas glândulas das formigas aqui estudadas,

podem ter sido obtidos pela alimentação, interação com a vegetação ou mesmos podem ser produzidos pelas próprias formigas. Os compostos fitoquímicos com atividade antimicrobiana e antioxidante compartilhados entre as espécies incluem o Octacosano, Eicosano, 2-metil e Eicosano, 10-metil conforme descrito em estudos recentes (Wei & Liu, 2020; Balachandran, 2023; Marzouk et al., 2023). Enquanto os exclusivos de *P. clavata* incluem 1-docoseno, Tetracosano, o 17-Pentatriaconteno, 1,19-Eicosadieno (More et al., 2022; Bughio, 2017; Akkoyunlu e Dulger, 2022; Rahmani et al., 2022; Oluwasina et al., 2019) e Hexatriacontano que revelou potencial anticancerígeno (Kaskoos & Ahamad, 2022).

Em *P. crassinoda*, os compostos com maiores porcentagens de massa foram 1-Eicosanol, exclusivo desta espécie, e o 1-Pentadeceno, compartilhado entre as duas. O 1-Eicosanol foi identificado na cabeça das abelhas sem ferrão *Hypotrigona ruspilii* (Magretti, 1898) (Ndungu et al., 2018), e como feromônio da glândula mandibular em *Apis florea* (Fabricius, 1787) (Oluwasina et al., 2019). O 1-Pentadeceno é descrito como um feromônio de ovoposição comunal da mosca negra *Simulium vittatum* (Simuliidae: Laubach 1916) (McGaha et al., 2015), e de agregação nos besouros Tenebrionidae *Tribolium* spp. (Macleay, 1825) (Arnaud et al., 2002), mas em altas concentrações revelam toxicidade para insetos (Dukic et al., 2021).

Outros compostos exclusivos identificados em *P. crassinoda* incluem o dodecano, 2,6,11-trimetil-, encontrados no extrato de algas vermelhas *Laurencia caspica* (Moshfegh et al., 2019), e o docosano, 7-hexil-, identificado como hidrocarboneto cuticular em vespa Chalcidoidea *Elisabethiella stickenbergi* (Van der Merwe, 2012).

A glândula faríngea em formigas é associada muitas vezes por desempenhar um papel crucial na liberação de hidrocarbonetos, os quais são sintetizados no corpo gorduroso e subsequentemente transferidos para a cutícula pela lipoforina até chegar na glândula faríngea por meio de autolimpeza. Esses hidrocarbonetos são essenciais na produção do odor que permite o reconhecimento das companheiras do ninho (Soroker e Hefetz, 2000). Esta função foi proposta com base em análises que demonstraram a presença dos mesmos hidrocarbonetos tanto na glândula quanto na cutícula dessas formigas (Soroker et al., 1994). A abundância de hidrocarbonetos identificados nas análises químicas aqui realizadas sugere uma relação direta com a função da glândula em ambas as espécies. Estudos adicionais sobre os hidrocarbonetos cuticulares em *P. clavata* e *P. crassinoda* podem oferecer dados complementares para validar esta hipótese. Embora uma ampla variedade de compostos tenha sido identificada nos complexos glandulares pré-faríngeo o faríngeo de *P. crassinoda* e *P. clavata*, muitos permanecem não identificados, destacando a necessidade de novos testes para sua

caracterização. Tais esforços são essenciais para elucidar a importância desses compostos para as glândulas dessas espécies.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no trabalho evidenciam diferenças morfológicas tanto na glândulas pré-faríngeas quanto nas glândulas faríngeas possivelmente atrelada as necessidades funcionais específicas em cada uma das espécies.

A análise das glândulas pré-faríngeas de *P. clavata* e *P. crassinoda* mostrou diferenças significativas em sua morfologia, estrutura celular e volume glandular. Enquanto *P. clavata* apresentou uma glândula volumosa com morfologia alongada e complexos sistemas de ductos, *P. crassinoda* evidenciou glândulas menores em formato de cachos de uvas e uma única abertura para liberação da secreção na faringe. Além disso, observou-se uma correlação positiva entre o volume da glândula e distância interocular em *P. clavata*, mas não em *P. crassinoda*. As análises histoquímicas também indicaram diferenças na detecção de proteínas, glicoproteínas, carboidratos e lipídios entre as espécies.

As glândulas faríngeas de *P. clavata* e *P. crassinoda* revelou diferenças distintas em sua morfologia e composição celular. Enquanto *P. clavata* exibiu uma estrutura semelhante a uma luva com projeções tubulares, *P. crassinoda* apresentou glândulas lobadas distintas. Além disso, as análises histológicas e histoquímicas demonstraram variações na composição celular e na intensidade de corantes entre as duas espécies, essas variações sugerem adaptações específicas relacionadas à função glandular e à composição química das secreções entre as espécies para comunicação química em suas colônias.

Os compostos químicos identificado nas glândulas de ambas as espécies foram predominantemente formados por hidrocarbonetos, sugerindo um possível papel da glândula faríngea na captação e liberação de hidrocarbonetos para a comunicação interespecíficas dentro das colônias das formigas estudadas.

Esses resultados inéditos para as espécies *P. clavata* e *P. crassinoda* evidenciam a importância das glândulas pré-faríngea e faríngea nas funções metabólicas e comunicação química nas colônias de formiga. Este trabalho contribui significativamente para o conhecimento da biologia desses insetos sociais, fornecendo dados relevantes para pesquisas posteriores sobre o comportamento, fisiologia e ecologia dessas espécies.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akkoyunlu, A.; Dulger, G. **Chemical composition and *in vitro* antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative studies of the *Lamium galeobdolon* L. (L.) Essential Oil.** Russian Journal of Bioorganic Chemistry, v. 48, n 6, p. 1240, 2022.
- Almeida Toledo, L. F. **Histo-anatomia de glândulas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera).** Arquivos do Instituto Biológico, v. 34, n. 4, p. 321–329, 1967.
- Alves, Elane Borba. **A glândula metapleurale de formigas (Hymenoptera: Formicidae) com diferentes estilos de vida: morfologia e volatilômica.** Orientador: José Eduardo Serrão. 2023. 64f. Dissertação (Mestrado em Entomologia)- Programa de pós-graduação em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2023.
- Amaral, J. B. D.; Caetano, F. H. **The hypopharyngeal gland of leaf-cutting ants (*Atta sexdens rubropilosa*) (Hymenoptera: Formicidae).** Sociobiology, v. 46, n. 3, p. 515–524, 2005.
- Amaral, J. B.; Caetano, F. H. **The intramandibular gland of leaf-cutting ants (*Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908).** Micron, v. 37, n. 2, p. 154–160, 2006.
- AntWeb. Versão 8.106.1. Academia de Ciências da Califórnia, online em <https://www.antweb.org>. Acessado em 8 de jan. de 2024.
- Arias-Penna, T. M. Subfamilia Paraponerinae. In: E. Jiménez, F. Fernández, T. M. Arias, F. H. Lozano-Bambrano (eds.). **Sistemática, biogeografía y conservación de las hormigas cazadoras de Colombia.** Instituto de Investigación de recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colômbia, 2008. p. 119-122.
- Arnaud, L.; Lognay, G.; Verscheure, M.; Leenaers, L.; Gaspar, C.; Haubruge, E. **Is dimethyldecanal a common aggregation pheromone of *Tribolium* flour beetles?** Journal of Chemical Ecology, v. 28 n. 3, p. 523-532, 2002. DOI: 10.1023/a:1014587927784.
- Ayre, G. L. **The relationships between food and digestive enzymes in five species of ants (Hymenoptera: Formicidae).** The Canadian Entomologist, v. 99, p. 408–411, 1967.

- Baader, A. P. **The significance of visual landmarks for navigation of the giant tropical ant, *Paraponera clavata* (Formicidae, Ponerinae).** *Insectes Sociaux*, v. 43, p. 435-450, 1996.
- Baccaro, F.B.; Feitosa, R.M.; Fernandez, F.; Fernandes, I.O.; Izzo, T.J.; Souza, J. L. P; Solar, R. **Guia para os gêneros de formigas do Brasil.** vol. 1. INPA, Manaus, AM, 2015.
- Bagnères, A.G., Morgan, E.D. **The post-pharyngeal glands and the cuticle of Formicidae contain the same characteristic hydrocarbons.** *Experientia*, v. 47, p. 106–111, 1991. DOI: 10.1007/BF02041269.
- Balachandran, A.; Choi, S.B.; Beata, M.; Malgorzata, J.; Froemming, G.R.A.; Lavilla, C.A.; Billaccura, M.P.; Siyumbwa, S.N.; Okechukwu, P.N. **Antioxidant, wound healing potential and *in silico* assessment of naringin, eicosane and octacosane.** *Molecules*, v. 28, n. 3, p. 1043, 2023. DOI: 10.3390/molecules28031043.
- Billen, J. **Signal variety and communication in social insects.** *Proceedings of Netherlands Entomological Society Meeting*, v. 17, 2006.
- Billen, J. **The exocrine system of *Aneuretus simoni* (Formicidae, Aneuretinae).** *Asian Myrmecology*, v. 9, p. e009011 (1-16), 2017.
- Billen, J., Bauweleers, E., Hashim, R., Ito, F. **Survey of the exocrine system in *Protanilla wallacei* (Hymenoptera, Formicidae).** *Arthropod Structure and Development*, v. 42 n. 3, p. 173-183, 2013. DOI: 10.1016/j.asd.2013.01.001.
- Billen, J.; Al-Khalifa, M. S. **Morphology and ultrastructure of the pro- and post-pharyngeal glands in workers of *Pachycondyla sennaarensis*.** *Sociobiology*, v. 62, n. 2, p. 270–275, 2015. DOI: 10.13102/sociobiology.v62i2. 270-275.
- Billen, J.; Lin, C. C.; Esteves, F. A. **Novel exocrine glands in the foreleg coxae of *Discothyrea* ants.** *Arthropod Structure and Development*, v. 59, 100981, 2020. DOI: 10.1016/j.asd.2020.100981.
- Billen, J.; Peusens, G. **Ultrastructure de la glande propharyngienne chez les fourmis**

- formicines (Hymenoptera, Formicidae).** Actes des Colloques Insectes Sociaux, v. 1, p. 121-129, 1984.
- Boonen, S.; Billen, J. **Functional morphology of the maxillary and propharyngeal glands of *Monomorium pharaonis* (L.).** Arthropod Structure and Development, v. 45, n. 4, p. 325-332, 2016. DOI: 10.1016/j.asd.2016.04.005.
- Breed, M. **Allometry in the giant tropical ant, *Paraponera clavata*.** Insectes Sociaux, v. 49, p. 125-128, 2002. DOI: 10.1007/s00040-002-8290-2.
- Breed, M. D.; Harrison, J. **Worker size, ovary development, and division of labor in the giant tropical ant *Paraponera clavata*.** Journal of the Kansas Entomological Society, v. 61, p. 285-290, 1988.
- Bueno, O. C.; Bueno, F. C.; Diniz, E. A.; Schneider, M. O. Utilização de alimentos pelas formigas-cortadeiras. In: Vilela, E. F.; Santos, I. A.; Schoereder, J. H.; Serrão, J. E.; Campos, L. A. O.; Lino-Neto, J. **Insetos Sociais: da biologia à aplicação.** Viçosa, MG: Ed. UFV, 2008. p. 96-11.
- Bughio, S. H.; Samejo, M. Q.; Memon, S.; Bano, S.; Mughal, M. A.; Memon, A. A. **Chemical composition of the essential oils from *Tamarix dioica* and determination of its antibacterial activity.** International Journal of Food Properties, v. 20, p. 2660–2667, 2017. DOI:10.1080/10942912.2017.1387138.
- Caetano, F. H.; Jaffé, K.; Zara, F. J. **Formigas: biologia e anatomia.** Araras, São Paulo: Gráfica e Editora Topázio, 2002. 131 p.
- Cruz-Landim, C., Costa, R. A. C. **Structure and function of the hypopharyngeal glands of Hymenoptera: a comparative approach.** Journal of Comparative Biology, v. 3, n. 2, p. 151-63, 1998.
- Davidson, D. W.; Cook, S. C.; Snelling, R. R. **Liquid-feeding performances of ants (Formicidae): ecological and evolutionary implications.** Oecologia, v. 139, n. 2, p. 255-

- 266, 2004. doi: 10.1007/s00442-004-1508-4.
- Delsinne, T.; Sonet, G.; Arias-Penna, T. M. Subfamília Paraponerinae. In: Fernández, F.; Guerreiro, R. J.; Delsinne, T. (eds.). **Hormigas da Colômbia**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2019. p. 637-657.
- Dukic, N.; Andric, G.; Glinwood, R.; Ninkovic, V.; Anelkovic, B.; Radonjić, A. **The effect of 1-pentadecene on *Tribolium castaneum* behavior: Repellent or attractant?** Pest Management Science, v. 77, p. 4034-4039, 2021. DOI: 10.1002/ps.6428.
- Dyer, L. A. **A quantification of predation rates, indirect positive effects on plants, and foraging variation of the giant tropical ant, *Paraponera clavata*.** Journal of Insect Science, v. 2, n. 18, 2002. DOI: 10.1093/jis/2.1.18.
- Eelen, D.; Børgesen, L.; Billen, J. **Functional morphology of the postpharyngeal gland of queens and workers of the ant *Monomorium pharaonis* (L.).** Acta Zoologica, v. 87, p. 101–111, 2006.
- Fernandez, F.; Guerrero, R.; Sánchez Restrepo, A. **Systematics and diversity of Neotropical ants.** Revista Colombiana de Entomología, v. 47, e11082, 2021. DOI: 10.25100/socolen.v47i1.11082.
- Fritz, G.; Rand, A. S.; de Pamphilis, C. W. **The aposematically colored frog, *Dendrobates pumilo*, is distasteful to the large, predatory ant, *Paraponera clavata*.** Biotropica, v. 13, n. 2, p. 158, 1981. DOI: 10.2307/2387719.
- Gama, V.; Cruz Landim, C. **Estudo comparativo das glândulas do sistema salivar de formigas (Hymenoptera, Formicidae).** Naturalia, v. 7, p. 145-165, 1983.
- Gibbs, A. G. **Water-proofing properties of cuticular lipids.** American Zoologist, v. 38, p. 471-482, 1998.
- Guarda, C.; Lutinski, J. A. **Glandular secretions of ants (Hymenoptera: Formicidae): A review on extraction, chemical characterization, and antibiotic potential.** Sociobiology,

- v. 67 n. 1, p. 13–25, 2020. DOI:10.13102/sociobiology.v67i1.4277.
- 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.** Journal of Chemical Ecology, v. 14, n. 3, p. 1035-1058, 1988. DOI: 10.1007/BF01018791.
- Hefetz, A.; Errard, C.; Cojocaru, M. **Heterospecific substances in the post-pharyngeal gland secretion of ants reared in mixed groups.** Naturwissenschaften, v. 79, p. 417–420, 1992. DOI:10.1007/BF01138575.
- Herzner, G.; Ruther, J.; Goller, S.; Schulz, S.; Goettler, W.; Strohm, E. **Structure, chemical composition and putative function of the post-pharyngeal gland of the emerald cockroach wasp, *Ampulex compressa* (Hymenoptera, Ampulicidae).** Zoology, v. 114, n. 1, p. 36-45, 2011.
- Hölldobler, B.; Wilson, E. O. **Host tree selection by the Neotropical ant *Paraponera clavata* (Hymenoptera: Formicidae).** Biotropica, v. 22, n. 2, p. 213, 1990. DOI: 10.2307/2388416.
- Hölldobler, B.; Wilson, E. O. **The ants.** Cambridge, UK: Harvard University Press, 1990.
- Hossaert-McKey, M.; Orivel, J.; Labeyrie, E.; Pascal, L.; Delabie, J.; Dejean, A. **Differential associations with ants of three cooccurring extrafloral nectary-bearing plants.** Ecoscience, v. 8, n. 3, p. 325-335, 2001. DOI: 10.1080/11956860.2001.11682660.
- Howard, R. W.; Blomquist, G. J. **Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons.** Annual Review of Entomology, v. 50, p. 371-93, 2005. DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130359.
- Janzen, D. H.; Carroll, C. R. *Paraponera clavata* (Bala, Giant Tropical Ant). In: Janzen, D. H. (ed.) with 174 coauthors. **Historia Natural de Costa Rica.** 1st ed. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 1991. p. 766-767.
- Jesus, C. M. **Análise comparativa das glândulas pós-faríngea e sua participação na**

- utilização de lipídeos pelas formigas (Hymenoptera: Formicidae).** 2012. 136 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2012.
- Kaskoos, R. A.; Ahamad, J. **Analysis of chemical composition by GC/MS and assessment of anticancer activity of *Rhubarb Rheum ribes* Linn. Stalks.** Indian Journals, v. 24 n. 4, p. 413-419, 2022. DOI: 10.5958/0974-4517.2022.00049.0.
- Lenoir, A.; Hefetz, A.; Simon, T.; Soroker, V. **Comparative dynamics of gestalt odour formation in two ant species *Camponotus fellah* and *Aphaenogaster senilis* (Hymenoptera: Formicidae).** Physiological Entomology, v. 26, p. 275-283, 2001. DOI:10.1046/j.0307-6962.2001.00244.x.
- Longino, J. **Formigas da Costa Rica.** 2014. Disponível em: <http://academic.evergreen.edu/projects/ants/AntsofCostaRica.html>. Acesso em: 21 nov. 2014. Acessado em: 04 abr. 2024.
- Lucas, C.; Pho, D. B.; Fresneau, D.; Jallon, J. M. **Hydrocarbon circulation and colonial signature in *Pachycondyla villosa*.** Journal of Insect Physiology, v. 50, n. 7, p. 595-607, 2004. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2004.04.006.
- Mackay, W.; Mackay, E. **The systematics and biology of the New World ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera: Formicidae).** p, 642, 2010. DOI: 10.13140/2.1.4271.8726.
- Marzouk, M.; Farid, M. M.; Fathy, H.; Abd Elshakour, Z.; Sokkar, N. **GC/MS analysis and secondary metabolites determination with antioxidant and anticancer evaluation of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. through micropropagated cultures.** Egyptian Journal of Chemistry, v. 66, n. 11, p. 211-223, 2023.
- McGaha, T. W.; Young, R.M.; Burkett-Cadena, N.D; Iburg, J.P.; Beau, J.M.; Hassan, S.; Katholi, C.R.; Cupp, E.W.; Bker, B.J.; Unnasch, t.R.; Noblet, R. **Identification of communal oviposition pheromones of the black fly *Simulium vittatum*.** PLoS ONE, v. 10 n. 3, p. e0118904, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0118904.

- More, K.; Tayade, S.; Gawande, P.; Manik, S.; Shelke, D. **Antioxidant and antimicrobial potential of *Canavalia gladiata* (Jacq.) DC. leaves and seeds: GC-MS based metabolic profiling.** Indian Journal of Natural Products and Resources, v. 13, p. 163-169, 2022. DOI: 10.56042/ijnpr.v13i2.47499.
- Moroń, D.; Witek, M.; Woyciechowski, M. **Division of labour among workers with different life expectancy in the ant *Myrmica scabrinodis*.** Animal Behaviour, v. 75, p. 345-350, 2008. DOI: 10.1016/j.anbehav.2007.06.005.
- Moshfegh, A.; Salehzadeh, A.; Sadat Shandiz, S. A.; Shafaghi, M.; Naeemi, A.; Salehi, S. **Phytochemical analysis, antioxidant, anticancer and antibacterial properties of the caspian sea red macroalgae, *Laurencia caspica*.** Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science, v. 43, p. 49-56, 2019. DOI: 10.1007/s40995-017-0388-5.
- Muscudere, M.; Willey, T.; Traniello, J. **Age and task efficiency in the ant *Pheidole dentata*: young minor workers are not specialist nurses.** Animal Behaviour, v. 77, p. 911-918, 2009. DOI: 10.1016/j.anbehav.2008.12.018.
- Ndungu, N.; Kiatoko, N.; Sole, C. L.; Pirk, C.; Yusuf, A. A.; Raina, S.; Masiga, D. **Resolving taxonomic ambiguity and cryptic speciation of *Hypotrigna* species through morphometrics and DNA barcoding.** Journal of Apicultural Research, v. 57, n3, p. 1-10, 2018 DOI: 10.1080/00218839.2018.1426348.
- Nenadi, M.; Soković, M.; Calhelha, R.C.; Ferreira, I.C.F.R.; Ciric, A.; Vesovic, N.; Curcic, S. **Inhibition of tumour and non-tumour cell proliferation by pygidial gland secretions of four ground beetle species (Coleoptera: Carabidae).** Biologia, v. 73, p. 787–792, 2018. DOI: 10.2478/s11756-018-0082-x.
- Niculita, H.; Billen, J.; Keller, L. **Comparative morphology of cephalic exocrine glands among castes of the black ant *Lasius niger*.** Arthropod Structure and Development, v. 36,

- p. 135-141, 2007. DOI: 10.1016/j.asd.2006.10.002.
- Noirot, C.; Quennedey, A. **Fine structure of insect epidermal glands**. Annual Review of Entomology, v. 9, p. 61–80, 1974.
- Oluwasina, O. O.; Ezenwosu, I. V.; Ogidi, C. O.; Oyetayo, V. O. **Antimicrobial potential of toothpaste formulated from extracts of *Syzygium aromaticum*, *Dennettia tripetala*, and *Jatropha curcas* latex against some oral pathogenic microorganisms**. AMB Express, v. 9, n.20, 2019. DOI: 10.1186/s13568-019-0744-2.
- Overall, W. L. **Defensive chemical weaponry in the ant *Pachycondyla harpax* (Formicidae, Ponerinae)**. Journal of Entomological Science, v. 22, p. 268-269, 1987.
- Peregrine, D. J.; Mudd, A.; Cherrett, J. M. **Anatomy and preliminary chemical analysis of the post-pharyngeal glands of the leaf-cutting ant, *Acromyrmex octospinosus* (Reich.) (Hym., Formicidae)**. Insectes Sociaux, v. 20, p. 355-363, 1973. DOI: 10.1007/BF02226088.
- Qadir, I.; Qamar, A.; Paul, B.; Mir, A. **Cuticular hydrocarbons C14-C36 are potential contact pheromonal elements modulating some behaviors in *Zygogramma bicolorata* (Coleoptera: Chrysomelidae)**. Biologia, v. 76, p. 123-132, 2021. DOI: 10.2478/s11756-020-00515-w.
- Rahmani, R.; El Arbi, K.; Aydi, S. S.; Hzami, A.; Tlahig, S.; Najar, R.; Aydi, S.; Debouba, M. **Biochemical composition and biological activities of *Salicornia europaea* L. from Southern Tunisia**. Journal of Food Measurement and Characterization, v. 16, p. 4833–4846, 2022. DOI: 10.1007/s11694-022-01574-0.
- Ravary, F.; Lecoutey, E.; Kaminski, G.; Châline, N.; Jaisson, P. **Individual experience alone can generate lasting division of labor in ants**. Current Biology, v. 17, n. 15, p. 1308-1312, 2007. DOI: 10.1016/j.cub.2007.06.047.
- Richard, F-J; Poulsen, M; Drijfhout, F; Jones, G; Boomsma, J.J. **Specificity in chemical profiles of workers, brood and mutualistic fungi in *Atta*, *Acromyrmex*, and**

- Sericomyrmex fungus-growing ants*. Journal of Chemical Ecology, v. 33, n. 12, p. 2281-2292, 2007. DOI: 10.1007/s10886-007-9385-z.
- Richter, A.; Keller, R. A.; Rosumek, F. B.; Economo, E. P.; Hita Garcia, F.; Beutel, R. G. **The cephalic anatomy of workers of the ant species *Wasmannia affinis* (Formicidae, Hymenoptera, Insecta) and its evolutionary implications**. Arthropod Structure and Development, v. 49, p. 26-49, 2019. DOI: 10.1016/j.asd.2019.02.002.
- Richter, A.; Schoeters, E.; Billen, J. **Morphology and closing mechanism of the mandibular gland orifice in ants (Hymenoptera: Formicidae)**. Journal of Morphology, v. 282, n. 8, p. 1127-1140, 2021. DOI: 10.1002/jmor.21358.
- Samejo, M. Q.; Memon, S.; Bhangar, M. I.; *et al.* **Chemical composition of essential oils from *Alhagi maurorum***. Chemistry of Natural Compounds, v. 48, p. 898–900, 2012. DOI: 10.1007/s10600-012-0417-8.
- Schal, C.; Sevala, V.; Capurro, M. L.; Snyder, T. E; Blomquist, G. J; Bagnères A.G. **Tissue distribution and lipophorin transport of hydrocarbons and sex pheromones in the house fly, *Musca domestica***. Journal of Insect Science; v. 1, n. 12, 2001.
- Schmidt, C. A.; Shattuck, S. O. **The higher classification of the ant subfamily Ponerinae (Hymenoptera: Formicidae), with a review of Ponerinae ecology and behavior**. Zootaxa, v. 3817, n. 1, 2014. DOI: 10.11646/zootaxa.3817.1.1.
- Schoeters, E.; Billen, J. **The post-pharyngeal gland in *Dinoponera* ants (Hymenoptera: Formicidae): unusual morphology and changes during the secretory process**. International Journal of Insect Morphology & Embryology, v. 25, n. 4, p. 443–447, 1997. DOI: 10.1016/S0020-7322(96)00016-5.
- Schultheiss, P.; Nooten, S. S.; Wang, R.; Wong, M. K. L.; Brassard, F.; Guénard, B. **The abundance, biomass, and distribution of ants on Earth**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 119, n. 40, e2201550119, 2022.

- Serrão, J.E.; Martins, L.C.B.; Santos, P.P.; Gonçalves, W.G. Morfologia interna de poneromorfas. In: Delabie, J.H.C.; Feitosa, R.M.; Serrão, J.E.; Mariano, C.S.F.; Majer, J.D. (Orgs.). **As formigas poneromorfas do Brasil** [online]. Ilhéus, BA: Editus, 2015, pp. 247-269. ISBN 978-85-7455-441-9.
- Smith, C.R.; Suarez, A.V.; Tsutsui, N.D.; Wittman, S.E.; Edmonds, b.; Freauff, A.; Tillberg, C.V. **Nutritional asymmetries are related to division of labor in a queenless ant**. PLoS ONE, v. 6, n. 8, e24011, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0024011.
- Soroker, V. V.; Hefetz, A. **Hydrocarbon site of synthesis and circulation in the desert ant *Cataglyphis niger***. Journal of Insect Physiology, v. 46, n. 7, p. 1097-1102, 2000.
- Soroker, V.; Vienne, C.; Hefetz, A.; Nowbahari, E. **The post-pharyngeal gland as a "gestalt" organ for nestmate recognition in the ant *Cataglyphis niger***. Naturwissenschaften, v. 81, p. 510-513, 1994. DOI: 10.1007/BF01132686.
- Soroker, V.; Lucas, C.; Simon, T.; Hefetz, A.; Fresneau, D.; Durand, J. L. **Hydrocarbon distribution and colony odour homogenisation in *Pachycondyla apicalis***. Insectes Sociaux, v. 50, p. 212-217, 2003. DOI: 10.1007/s00040-003-0669-1.
- Tillberg, C. V.; Breed, M. D. **Placing an omnivore in a complex food web: dietary contributions to adult biomass of an ant**. Biotropica, v. 36, n. 2, p. 266-271, 2004. DOI: 10.1111/j.1744-7429.2004.tb00318.x.
- Tudor, A. E.; Starr, C. K.; Mohammed, K. **Trophic ecology of the ant *Pachycondyla crassinoda* (Formicidae: Ponerinae) in a lowland Neotropical forest**. Sociobiology, v. 63, n. 2, p. 744–747, 2016. DOI: 10.13102/sociobiology.v63i2.848.
- Van der Merwe, J. F. **Species-specific hydrocarbon profiles of South African fig wasp (Hymenoptera: Chalcidoidea) communities**. 2012. Dissertação (mestrado em Ciências em Zoologia)- Departamento de Botânica e Zoologia, Faculdade de Ciências, Universidade de Stellenbosch, Stellenbosch, ZA, 2012.

- Vander Meer, R. K.; Glancey, B. M.; Lofgren, C. S. **Biochemical changes in the culture, esophagus, and postpharyngeal gland of colony-founding imported red fire ant (*Solenopsis invicta*) queens.** *Insect Biochemistry*, v. 12, p. 123-127, 1982.
- Vienne, C.; Soroker, V.; & Hefetz, A. **Congruence of hydrocarbon patterns in heterospecific groups of ants: transfer and/or biosynthesis?** *Insectes Sociaux*, v. 42, n. 3, p. 267-277, 1995.
- Waddington, S. J.; Santorelli, L. A.; Ryan, F. R.; Hughes, W. O. H. **Genetic polyethism in leaf-cutting ants.** *Behavioral Ecology*, v. 21, n. 6, p. 1165–1169, 2010. DOI:10.1093/beheco/arq128.
- Wei, Q.; Liu, R. J. **Flower colour and essential oil compositions, antibacterial activities in *Lagerstroemia indica* L.** *Natural Products Research*, v. 36, n. 8, p. 2145-2148, 2022. DOI: 10.1080/14786419.2020.1843034.
- Xu, W.; He, H.; Billen, J. **Morphology of the exocrine glands associated with the maxillolabial complex in the ant *Camponotus japonicus* Mayr, 1866 (Hymenoptera: Formicidae).** *Insectes Sociaux*, v. 68, p. 59-67, 2021. DOI: 10.1007/s00040-020-00793-2.
- Xu, W.; Zhang, G.; Zhang, L.; Wang, X.; Billen, J.; He, H. **Morphology and ultrastructure of the prepharyngeal and pharyngeal glands in the ant *Camponotus japonicus*.** *Arthropod Structure and Development*, v. 71, n. 101212, 2022. DOI: 10.1016/j.asd.2022.101212.
- Young, A. M.; Hermann, H. R. **Notes on foraging of the giant tropical ant *Paraponera clavata* (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae).** *Journal of the Kansas Entomological Society*, v. 53, n. 1, p. 35–55, 1980.
- Zhang, D. Q.; Peng, K.; Guo, L.; Zhang, H. **GC/MS determination of bioactive components of waste leaves from *Platanus x acerifolia* (Alt.) Willd.** *Key Engineering Materials*, v. 480-481, p. 502-506, 2011. DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.480-481.502.

Zhang X, Shang Y, Ren L, Qu H, Zhu G, Guo Y. **A study of cuticular hydrocarbons of all life stages in *Sarcophaga peregrina* (Diptera: Sarcophagidae)**. Journal of Medical Entomology, v.59, n. 1, p. 108-119, 2022. doi: 10.1093/jme/tjab172.