



CAMPUS CAXIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS LICENCIATURA

EMYLE VITÓRIA OLIVEIRA DE SOUSA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA SECREÇÃO DA GLÂNDULA
METAPLEURAL DE *Paraponera clavata* (FABRICIUS, 1775) EM
MICRORGANISMOS**

Caxias, MA

2023



CAMPUS CAXIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS LICENCIATURA

EMYLE VITÓRIA OLIVEIRA DE SOUSA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA SECREÇÃO DA GLÂNDULA
METAPLEURAL DE *Paraponera clavata* (FABRICIUS, 1775) EM
MICRORGANISMOS**

Monografia apresentada ao Colegiado do Curso de Ciências Biológicas Licenciatura, da Universidade Estadual do Maranhão – *Campus* Caxias, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luiza Carla Barbosa Martins
Coorientadora: Prof^ª. Ms. Leticia da Silva

Caxias, MA

2023

S725p Sousa, Emyle Vitória Oliveira de

Potencial antimicrobiano da secreção da glândula metapleural de *Paraponera clavata* (FABRICIUS, 1775) em microrganismos / Emyle Vitória Oliveira de Sousa. __Caxias: Campus Caxias, 2023.

33f.

Monografia (Graduação) – Universidade Estadual do Maranhão – Campus Caxias, Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Luiza Carla Barbosa Martins

1. Formicidae. 2. Fungos. 3. Bactérias. 4. Patógenos. I. Título.

CDU 595.796

EMYLE VITÓRIA OLIVEIRA DE SOUSA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA SECREÇÃO DA GLÂNDULA
METAPLEURAL DE *Paraponera clavata* (FABRICIUS, 1775) EM
MICRORGANISMOS**

Monografia apresentada ao Colegiado do Curso de Ciências Biológicas Licenciatura, da Universidade Estadual do Maranhão – *Campus* Caxias, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Aprovado em 17 de julho de 2023

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Luiza Carla Barbosa Martins – Orientadora
Doutora em Entomologia
Universidade Estadual do Maranhão

Prof^ª. Me. Luciana Rocha Paula – Membro
Mestre em Biodiversidade, ambiente e saúde
Universidade Estadual do Maranhão

Prof^ª. Paula Letycia Nunes de Souza – Membro
Mestranda em Biodiversidade, Ambiente e Saúde
Universidade Estadual do Maranhão

Dedico com carinho a minha família, em especial ao meu querido avô Antônio Pereira de Sousa (in memorian), por todo apoio e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, por ter me concedido todas as oportunidades e forças para a conclusão em todas as minhas etapas acadêmicas.

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais Edinalva Oliveira e Edvaldo da Silva, a minha irmã Stefane Eduarda, aos meus avós Edi Oliveira, Antônio Pereira (*in memorian*) e Rosa Oliveira, e aos meus tios e tias, por sempre acreditarem em mim, sendo o meu maior suporte durante toda a minha formação, a vocês, deixo aqui a minha eterna gratidão.

Agradeço a todos os meus amigos que sempre se fizeram presentes durante os momentos de alegrias e dificuldades, me encorajando, motivando e auxiliando quando necessário.

A Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, pela formação, ao curso de Ciências Biológicas Licenciatura e a todo o corpo docente que contribuíram para a minha graduação.

As agências Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo fomento concedido às pesquisas.

A Professora Dr^a. Luiza Carla Barbosa Martins, por todo apoio e orientação durante estes anos, na iniciação científica e na realização deste trabalho de conclusão.

A coorientadora Professora Me. Leticia da Silva, por todo companheirismo e apoio prestados durante a execução desta pesquisa.

Aos meus colegas do Laboratório de Mirmecologia/LAMIR do *Campus* Caxias/UEMA, em especial a Prof^a. Elane Borba e Prof^a. Irani Silva por todas as contribuições, pelo apoio e auxílio na realização das coletas e manutenção das colônias.

A equipe do Laboratório de Microbiologia e Imunologia das Doenças Infecciosas-LAMIDI do *Campus* Caxias/UEMA, em nome do Professor Dr. Francisco Laurindo, por toda estrutura e apoio fornecido para a realização de todos os testes da pesquisa.

A Professora Dr^a. Joseleide Teixeira Câmara, por todo apoio, carinho, e ensinamentos compartilhados durante estes anos.

A turma 2019.1, por todos os momentos de alegrias e companheirismos proporcionados durante a graduação, em especial ao meu querido amigo Marcos Augusto, por ter nos motivado com toda a sua força e esperança, apesar de todas as situações.

E a todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram significativamente.

A todos vocês a minha imensa gratidão!

*“Fica sempre, um pouco de perfume nas mãos
que oferecem rosas...”*

Alberto Costa

RESUMO

As formigas encontram-se em condições microclimáticas que favorecem o desenvolvimento de alguns microrganismos. Elas produzem mecanismos de preservação da saúde da colônia e como estratégia de defesa, esses insetos desenvolvem glândulas exócrinas que atuam na produção de antibióticos, agindo como defesa química e na defesa imunológica da colônia. A glândula metapleurale tem importância relevante nessa questão, e a espécie de Formicidae, *Paraponera clavata*, também conhecida como Tucandeira ou Tocandira, é a única representante vivente da subfamília Paraponerinae e da tribo Paraponerini. Dessa forma, este trabalho foi realizado com os objetivos de analisar atividade antimicrobiana da secreção da glândula metapleurale de *P. clavata* sobre os fungos e bactérias, utilizando cepas do fungo da espécie *Cândida albicans* e da espécie de bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, a fim de confirmar o seu potencial antimicrobiano e contribuir significativamente com a literatura científica. Para a obtenção do material biológico, foi realizada a localização dos ninhos de *P. clavata* e os espécimes foram coletados, sobre a autorização de número **65044/1** do SISBio, e transferidos para ninhos artificiais confeccionados a partir de caixas plásticas, contendo substrato dos ninhos originais e nutritivos como maçãs e mel, em seguida, foram levados para o Laboratório de Mirmecologia-LAMIR, do *Campus Caxias*, da Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, para realizar a manutenção da colônia e obtenção dos extratos através da extração das glândulas dos espécimes coletados. A testagem antimicrobiana foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Imunologia das Doenças Infecciosas-LAMIDI, do *Campus Caxias-UEMA*, e dividida em cinco etapas, sendo elas: 1. obtenção dos extratos da glândula metapleurale de *P. clavata*, 2. preparação das amostras dos microrganismos (*P. aeruginosa* e *C. albicans*), 3. preparo dos meios de cultura (ágar), 4. testes de suscetibilidade e 5. teste antimicrobiano. As análises dos resultados se deram através da identificação da presença e mensuração de halos de inibição, formados ao redor dos discos com o extrato da glândula metapleurale, sobre microrganismos *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Com base nos resultados obtidos verificou-se que houve atividade antimicrobiana da secreção da glândula metapleurale nos microrganismos, se manifestando com diversas variações entre as espécies *P. aeruginosa* e *C. albicans*, com ações mais significativas na bactéria *P. aeruginosa*. Desta forma, concluiu-se que a espécie de formiga *P. clavata*, apresenta potencial antimicrobiano na secreção de sua glândula metapleurale, tendo ação inibitória sobre as cepas da bactéria *P. aeruginosa* e sobre o fungo *C. albicans*, em concentrações de 50 pares de glândulas, sendo capaz de apresentar um maior potencial em concentrações superiores.

PALAVRAS-CHAVE: formicidae. fungos. bactérias. patógenos.

ABSTRACT

Ants live in microclimatic conditions that favor the development of some microorganisms. They produce mechanisms to maintain colony health, and as a defense strategy, these insects develop exocrine glands that play a role in antibiotic production, chemical defenses, and colony immunological defenses. The metapleural gland is of relevant importance in this matter, and the Formicidae species *Paraponera clavata*, also known as Tucandeira or Tocandira, is the sole living representative of the Paraponerinae subfamily and Paraponerini phylum. Therefore, this work was carried out with the aim of analyzing the antimicrobial activity of the metapleural gland secretion of *P. clavata* on fungi and bacteria, using strains of the fungal species *Candida albicans* and the bacterial species *Pseudomonas aeruginosa* to confirm their antimicrobial potential and to make a significant contribution to the scientific literature. In order to obtain the biological material, the localization of the nests of *P. clavata* was carried out and the specimens were collected under authorization number 65044/1 by SISBio and transferred to artificial nests made of plastic boxes containing substrate from the original and nutritious nests such as apples and honey, and then taken to the Laboratory of Myrmecology-LAMIR at the Caxias campus of the State University of Maranhão-UEMA to carry out the care of the colony and the procurement of extracts by extraction of the glands of the collected specimens. Antimicrobial tests were carried out at the Laboratory of Microbiology and Immunology of Infectious Diseases-LAMIDI, Campus Caxias-UEMA and were divided into five phases, namely: 1. Obtaining extracts from the metapleural gland of *P. clavata*, 2. Preparation of samples of microorganisms (*P. aeruginosa* and *C. albicans*), 3. Preparation of culture media (agar), 4. Susceptibility tests and 5. Antibacterial test. microbial. The results were analyzed by identifying and measuring zones of inhibition that had formed around the intervertebral discs with the extract of the metapleural gland on the microorganisms *P. aeruginosa* and *C. albicans*. Based on the obtained results, it was confirmed that there was an antimicrobial activity of the metapleural gland secretion in the microorganisms, which was manifested in several variations between the species *P. aeruginosa* and *C. albicans*, with more significant effects on the bacterium *P. aeruginosa*. Thus, it was concluded that the ant species *P. clavata* has antimicrobial potential in the secretion of its metapleural gland by exerting an inhibitory effect on the bacterial strains *P. aeruginosa* and on the fungus *C. albicans* at concentrations of 50 gland pairs and may show greater potential at higher concentrations.

KEYWORDS: formicidae. mushrooms. bacteria. pathogens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização da APA Municipal do Inhamum em Caxias, MA.....	20
Figura 2 – Coletas de <i>Paraponera clavata</i>	21
Figura 3 – Obtenção dos extratos da glândula.....	22
Figura 4 – Reativação dos microrganismos.....	23
Figura 5 – Preparo dos testes antimicrobianos.....	24
Figura 6 – Mensuração dos halos de inibição em placas teste.....	25
Figura 7 – Análise da placa de <i>P. aeruginosa</i>	27
Figura 8 – Análise da placa de <i>C. albicans</i>	29
Figura 9 – Gráfico comparativo das ações antimicrobiana.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados das análises de *Pseudomonas aeruginosa*.....25

Tabela 2 – Dados das análises de *Cândida albicans*.....27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 Formicidae e glândulas exócrinas.....	15
2.1.2 Glândula metapleral.....	16
2.1.3 Microrganismos patógenos	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Área de coleta e Material Biológico	20
3.2 Atividade Antimicrobiana	21
3.2.1 Obtenção dos extratos.....	21
3.2.2 Amostras dos microrganismos	22
3.2.3 Preparo dos meios de cultura para os testes de suscetibilidade	22
3.2.4 Testes antimicrobianos pelo método de difusão em ágar.....	23
3.2.5 Leituras dos dados.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

As formigas encontram-se em condições microclimáticas que favorecem o desenvolvimento de microrganismos. Para isso, elas produzem mecanismos de preservação da saúde da colônia e como estratégia de defesa, esses insetos desenvolveram glândulas exócrinas que atuam na produção de antibióticos, agindo como defesa química e na defesa imunológica da colônia (GUARDA e LUTINSKI, 2020).

Dentre as mais de 16 mil espécies de Formicidae (ANTWEB, 2023), *Paraponera clavata*, também popularmente conhecida como Tucandeira ou Tocandira, é a única representante vivente da subfamília Paraponerinae e da tribo Paraponerini. Esta espécie apresenta em sua anatomia diversas glândulas exócrinas, com destaque para a sua glândula metapleural, que tem prospecção pelo seu efeito antimicrobiano sobre microrganismos.

Atualmente as formigas possuem o sistema exócrino mais desenvolvido entre outros insetos, apresentando uma grande variedade de glândulas exócrinas que compreendem mais de 90 glândulas já descritas (WANG *et al.* 2021). As glândulas mais citadas na literatura científica são as glândulas metapleural, mandibular, de veneno e Dufour (TRAGUST, 2016; BILLEN, 2017).

Dentre essas, destaca-se a glândula metapleural, com grande importância científica, ela consiste em um par de estruturas localizadas na região póstero-lateral do tórax e era considerada exclusiva para formigas, porém recentemente esta estrutura deixou de ser uma sinapomorfia para as formigas e foi identificada em *Pelecinus polyturator*, uma espécie de vespa, com posição, estrutura e compostos químicos semelhantes à glândula metapleural de Formicidae (GUARDA e LUTINSKI, 2020; ULMER *et al.*, 2023).

A glândula metapleural têm bastante relevância pelo seu potencial de produzir antibióticos capazes de inibir fungos e bactérias que se desenvolvem dentro das colônias (GUARDA e LUTINSKI, 2020). Esta glândula varia seu tamanho entre as espécies, e em muitas, produz uma secreção antimicrobiana que flui livremente na cutícula ou pode ser espalhada pelos movimentos das pernas e tórax em algumas espécimes. As secreções desta estrutura possuem características ácidas, expressa como porções de ácido carboxílico ou fenol (HOLDOBLER e WILSON, 1990; YEK e MUELLER, 2011).

Devido a evolução dos insetos e a forte pressão para o desenvolvimento de defesas contra patógenos, atualmente, diversos insetos possuem em suas estratégias ações que

englobam vários fatores químicos que atuam contra a proliferação de microrganismos patogênicos que podem também acometer seres humanos (PENICK *et al.*, 2018).

Por serem consideradas seres altamente eussociais, as formigas trabalham em prol da melhor organização dos seus habitats (HOLLDOBLER, 1990), com isto, os estudos investigativos acerca da atividade antimicrobiana das glândulas exócrinas são cruciais para comprovar o comportamento bioindicador das formigas, logo, se elas apresentam mecanismos de defesa contra microrganismos, provavelmente os habitats de formigas com este potencial, como é o exemplo da *P. clavata*, dificilmente estará contaminado por microrganismos patogênicos.

Com isto, as formigas que se desenvolvem em fungos têm sido um grande incentivo às pesquisas destinadas à identificação de agentes antimicrobianos com substâncias de secreções glandulares, com atenção especial para a glândula metapleurar (GUARDA e LUTINSKI, 2020).

Entretanto, a atividade antimicrobiana de diversas espécies de formigas mantém-se desconhecida, sobretudo no que se refere a espécie *P. clavata*, tornando importante realizar estudos na área, principalmente pelo crescimento da resistência antimicrobiana diante dos fármacos atuais (SILVA *et al.*, 2022).

A realização de estudos como este trazem uma grande contribuição para a literatura científica como também para a saúde, além da identificação do potencial antimicrobiano da glândula, o estudo pode corroborar com dados bibliográficos sobre a composição química dos compostos secretados por essa glândula e sua influência no comportamento e na atividade antimicrobiana, compreendendo suas estratégias de forrageamento e nidificação da espécie em estudo.

Diante da lacuna observada em relação aos estudos sobre a prospecção do potencial antibiótico e antifúngico da glândula metapleurar de *P. clavata*, fica claro a relevância do conhecimento da ação antimicrobiana da secreção produzida por essa glândula, principalmente sobre os microrganismos patogênicos, que apresentam importância clínica, em função aos processos de resistência aos antimicrobianos já existentes na rede de fármacos. Além disto, o trabalho contribuirá significativamente com as fontes de pesquisa acadêmicas, pois além dos trabalhos de Silva *et al.* (2022), nenhum outro estudo apresenta dados da ação antimicrobiana da glândula metapleurar, especificamente com a espécie *P. clavata*.

Dessa forma, este trabalho foi realizado com os objetivos de analisar atividade antimicrobiana da secreção da glândula metapleural de *P. clavata* sobre os fungos e bactérias, utilizando cepas do fungo da espécie *Cândida albicans* e da espécie de bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, a fim de confirmar o seu potencial antimicrobiano e contribuir significativamente com a literatura científica.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Formicidae e glândulas exócrinas

As formigas são insetos sociáveis que vivem em colônias, caracterizadas por uma densa agregação de indivíduos relacionados que interagem facilmente uns com os outros (TRAGUST, 2016; PENICK *et al.*, 2018). Atualmente, um grande número de glândulas já foi descrito, e com isto o estudo de muitas dessas glândulas em formigas tem a pretensão de identificar e explorar suas funções, pois em muitas delas ainda não é conhecida sua utilidade (BILLEN, 2019).

Por mais que nestes habitats haja um grande aglomerado entre os indivíduos, as formigas ainda assim conseguem se relacionar de forma organizada e bem social, realizando suas atividades e evitando a manifestação de microrganismos patógenos dentro da colônia (GUARDA e LUTINSKI, 2020). Com isto, as formigas fazem uso de secreções produzidas em glândulas exócrinas na comunicação dos indivíduos da colônia como parte da organização social, por exemplo, feromônios de trilha, de alarme e marcação territorial (PEREIRA, 2019). Estes fatores, dentro da colônia, geram microambientes ideais para o desenvolvimento de microrganismos simbióticos ou que colocam a colônia em risco de doenças potencialmente letais (HOLDOBLER, 1990; TRANTER *et al.*, 2015; PENICK *et al.*, 2018).

O processo do uso de secreções é variável, podendo ser realizado com uma mistura única de compostos e concentrações variáveis para alterar a função das suas substâncias glandulares. O mesmo composto pode ser produzido por diferentes glândulas e têm várias funções (ADAMS *et al.*, 2012; GUARDA e LUTINSKIN, 2020).

Algumas formigas se desenvolvem com fungos e por este motivo têm-se incentivado pesquisas destinadas a identificar agentes antimicrobianos nas substâncias de secreções glandulares, com atenção especial para a glândula metapleurar. As glândulas mais frequentemente relatadas nos artigos envolvendo a extração de secreções de formiga foram Dufour (21,15%), metapleurar (15,38%) e mandibular (11,53%) (GUARDA e LUTINSKIN, 2020).

Penick *et al.* (2018), destaca que as interações sociais também podem desempenhar um papel importante para desempenho de atividades antimicrobiana, como é o exemplo de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*, suas glândulas metapleurais resistem a infecções

fúngicas, mas essa resistência é mais eficaz quando outras formigas estão presentes para ajudar a preparar e espalhar as secreções.

Vieira (2012), ressalta a importância da realização de estudos comparativos de glândulas metapleurais de formigas que habitam em ambientes diferentes e com hábitos de forrageamento distintos, a fim de explicar os princípios ativos da ação da glândula.

Dentre as atividades antimicrobianas com glândulas exócrinas, destaca-se a glândula que está presente na placa propleural das formigas-fungosas (Attinis), que comporta bactérias especializadas que produzem antibióticos contra as bactérias altamente patogênicas. Enquanto esta glândula está ligada a produção de antibióticos altamente específicos, a glândula metapleural é mais ativa na produção de antibióticos de amplo espectro (CURRIE *et al.*, 2006; BILLEN, 2019).

Para Bot *et al.* (2002), a glândula metapleural é uma forte linha de defesa geral da Formicidae, compondo um sistema de defesa único contra infecções microbianas, que é compartilhado por todas as formigas, exceto em alguns casos isolados em que a glândula foi perdida secundariamente.

Guarda e Lutinski (2020), afirmam a necessidade do conhecimento da atividade antimicrobiana da maioria das secreções glandulares de formigas, bem como para a maioria dos táxons. Por estes motivos, as formigas que se desenvolvem em fungos têm sido um grande incentivo às pesquisas destinadas à identificação de agentes antimicrobianos com substâncias de secreções glandulares, com atenção especial para a glândula metapleural (GUARDA e LUTINSKI, 2020).

2.1.2 Glândula metapleural

Nas espécies de Formicidae a posição da glândula metapleural tem uma localização estratégica e propícia para as formigas operárias usarem suas pernas para espalhar os produtos exócrinos a si mesmas, companheiras de ninho e/ou substratos dentro do ninho (MEER, 2012).

Os métodos de extração das glândulas exócrinas mais utilizados por alguns autores são a maceração da glândula e extração com solventes tais como acetona, clorofórmio, diclorometano, hexano, metanol, pentano, etanol, extração direta da glândula e maceração da glândula em água (GUARDA e LUTINSKI, 2020).

Em formigas, essa glândula apresenta em suas atividades, funções específicas para suas colônias como reconhecimento de espécies, marcação de território, defesa química, antissepsia (YEK e MUELLER, 2011).

Estudos apontam que esta glândula exócrina apresenta em suas secreções componentes químicos como: ácido 3-hidroxicáprico, ácido indolacético, ácido fenilacético, ácido 3-hidroxicáprico e ácido heptadecanóico (YEK e MUELLER, 2011) As secreções da glândula metapleurale de Formicidae são altamente ácidas, e os efeitos antimicrobianos das secreções podem estar relacionados fortemente com a acidez de seus compostos (MASCHWITZ, 1974; YEK e MUELLER, 2011).

Yek e Mueller (2011), afirmam que outros autores já sugeriram o desempenho antisséptico da glândula metapleurale de uma forma geral, em razão de combinações de acidez bacteriostática e possíveis antibióticos não específicos de secreções da glândula, atuando assim com uma ação inibitória de microrganismos prejudiciais à saúde das formigas no ninho.

Ainda que a glândula metapleurale tenha esta grande prospecção para ação antimicrobiana, um número reduzido de estudos já investigou seu potencial antibiótico, levando concentração para estudos com espécies que são cultivadas em fungos, como o caso da *Attae Acromyrmex*. (YEK e MUELLER, 2011).

Lockhart (2007), certifica o potencial da glândula relatando um estudo australiano, realizado com as secreções da glândula metapleurale de *Myrmecia nigriscapa*, onde o extrato inibiu intensamente seis de sete fungos, devido a presença e aglutinação de vários ácidos, como o ácido fenilacético que é altamente tóxicos para fungos.

2.1.3 Microrganismos patógenos

A grande evolução em relação à resistência de microrganismos aos antibióticos convencionais tem trazido uma grande preocupação de saúde pública. A presença da resistência de microrganismos, principalmente entre patógenos clinicamente perigosos, tem levado a um aumento na necessidade de novos fármacos e novas classes de antibióticos, tanto para infecções adquiridas em hospitais quanto na comunidade (SILVA e AQUINO, 2018).

Rang *et al.* (2016), afirma que há muitos anos os medicamentos foram desenvolvidos para combater infecções por bactérias, entretanto, os microrganismos

acompanharam esse desenvolvimento juntamente com sua resistência contra os fármacos. Isto levou a produção de novos antibióticos mais fortes.

O microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria causadora de infecções que estão associadas a alta morbidade e mortalidade em muitos grupos, provocando doenças como pneumonia, doença pulmonar obstrutiva crônica ou fibrose cística. *P. aeruginosa* está na categoria “crítica” da lista prioritária de patógenos bacterianos da Organização Mundial da Saúde (OMS), tornando necessário a realização imediata de pesquisas e o desenvolvimento de novos antibióticos (JURADO-MARTEUN; SAINZ-MEJEUCOMO e McCLEAN, 2021).

Infecções causadas por bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, particularmente são problemáticas devido à resistência intrínseca que elas desenvolvem para múltiplas classes de antibióticos e sua habilidade em adquirir resistência adaptável durante um curso terapêutico (KOLLEF, 2005).

A resistência bacteriana é vista como um fenômeno natural que ocorre através do contato dos microrganismos com os antibióticos, onde pode ser identificado que a rápida evolução dessa resistência ocorre na mesma proporção em que se fazem o uso de fármacos. Este processo de seleção e de adaptação estimulou o desenvolvimento de resistência microbiana aos principais antibióticos, que são transmitidas vertical e horizontalmente (SANTANA *et al.*, 2016).

Os fungos também são responsáveis por estarem em destaque em relação as infecções que provocam e acometem a saúde pública. Os fungos do gênero *Candida* são ocupantes da microbiota normal do corpo humano, porém, podem ocasionar danos graves no contexto infeccioso.

Os sintomas clínicos oriundos de infecções causadas por fungos do gênero *Candida* incluem infecções de pele e mucosas, ou mesmo infecções sistêmicas, caracterizada pela disseminação da levedura pelo organismo (DEORUKHKAR e ROUSHANI, 2018; KAMIMURA *et al.*, 2013).

Candida albicans é uma espécie de fungo clinicamente importante, colonizando os tratos orais, gastrointestinal e genital de forma assintomática. Este fungo pode ser caracterizado em dois subtipos: **mucoso**, gerando doenças como candidíase vulvovaginal, e **sistêmico**,

afetando locais estéreis do corpo, como a corrente sanguínea e o sistema nervoso central (LOPES e LIONAKIS, 2022).

Além disto, o fungo *C. albicans* tem uma alta capacidade de modificar a sua morfologia, ocasionando o rompimento das barreiras da mucosa e causando doenças invasivas aos seres humanos (LOPES e LIONAKIS, 2022).

Na maioria das vezes, as infecções fúngicas têm como sugestão de tratamento o uso de drogas sintéticas, porém, estudos epidemiológicos demonstram a tendência dessas leveduras a adquirirem resistência a antifúngicos normalmente empregados para o tratamento da infecção (CANUTO e RODERO, 2002).

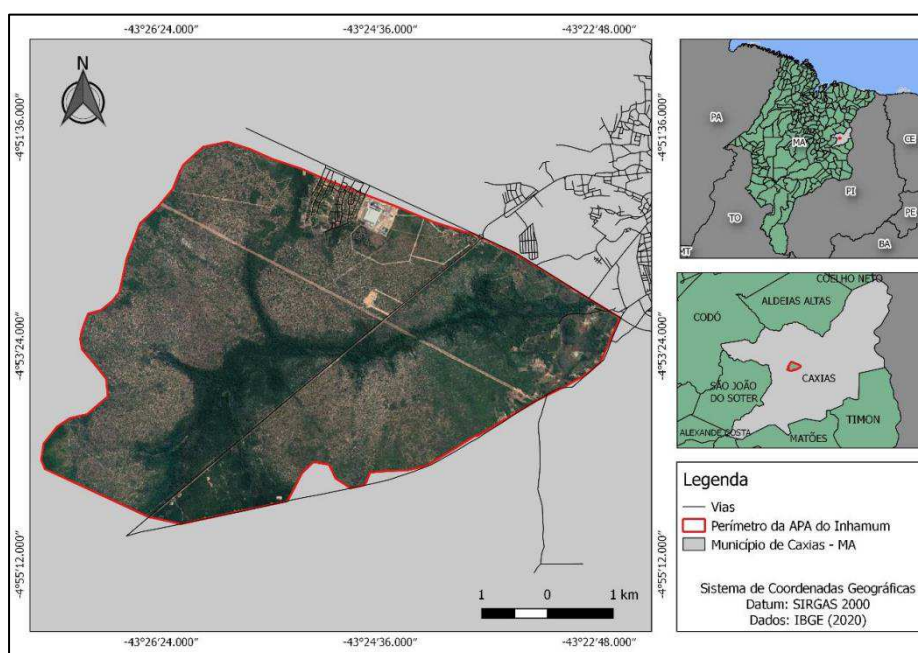
3 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa trata-se de uma análise de abordagem quali-quantitativa (SOUZA, 2017), visto que propõe a verificação da presença ou ausência da ação antimicrobiana da glândula metapleural, acompanhada de dados numéricos que complementam os resultados do estudo.

3.1 Área de coleta e Material Biológico

A Área de Proteção Ambiental Municipal (APA) do Inhamum foi criada pela lei 1.464/2001, localizando-se entre as coordenadas $-04^{\circ} 53' 30''$ de latitude S e $43^{\circ} 24' 53''$ de longitude W, a margem da BR-316, a aproximadamente 2 km do perímetro urbano de Caxias-MA (Figura 1). Com aproximadamente 4.500 hectares, tendo a configuração paisagística fisionomicamente o Cerrado (SILVA *et al.*, 2016).

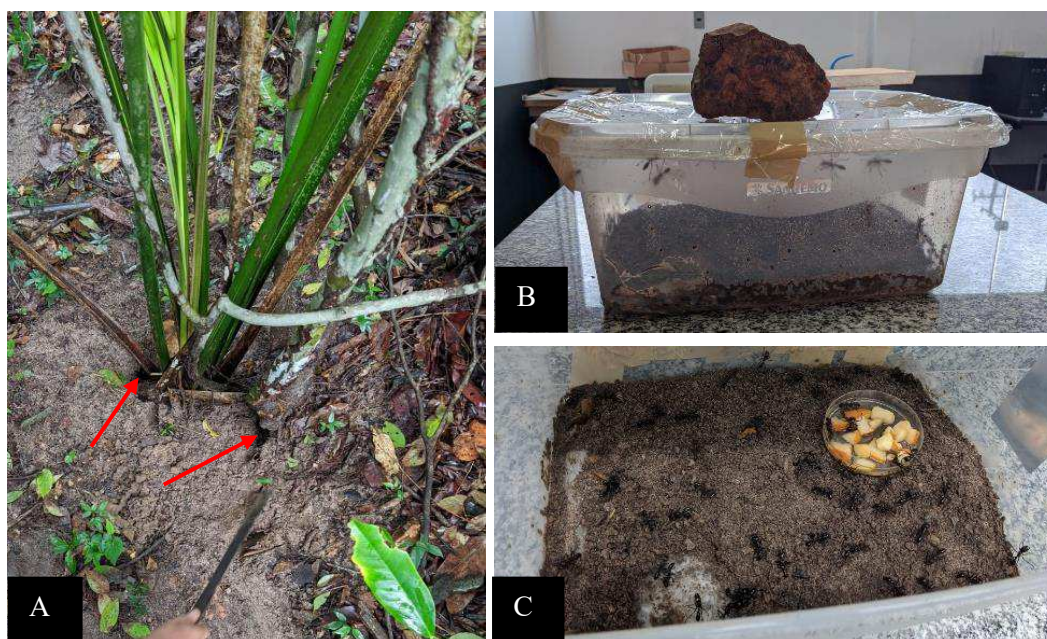
Figura 1 – Localização da APA Municipal do Inhamum em Caxias, MA



Fonte: PEREIRA *et al.*, 2021.

Para a obtenção do material biológico, foi realizada a localização dos ninhos de *P. clavata* (Figura 2 A) e os espécimes foram coletados, com o auxílio de uma pinça, sobre a autorização de número **65044/1** do SISBio, e transferidos para ninhos artificiais confeccionados a partir de caixas plásticas, contendo substrato dos ninhos originais e nutritivos como maçãs e mel, em seguida, foram levados para o Laboratório de Mirmecologia-LAMIR da Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, *Campus Caxias* (Figura 2 B e C).

Figura 2 - Coletas de *Paraponera clavata*. (A) Aberturas do ninho (setas). (B) Vista geral do ninho artificial. (C) ninho artificial com nutritivos



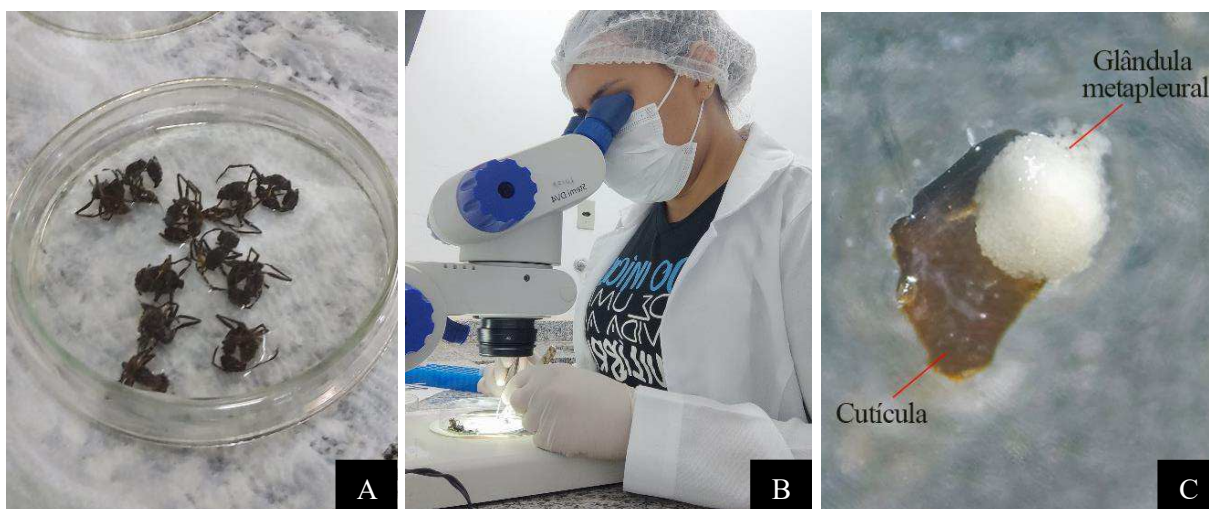
Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

3.2 Atividade Antimicrobiana

3.2.1 Obtenção dos extratos

Para a extração da glândula metapleurálica, as formigas de *P. clavata* foram crioanestesiadas (Figura 3A), dissecadas e as glândulas extraídas com o auxílio de um estereoscópio (lupa) e pinças (Figura 3 B e C). As glândulas foram armazenadas em solução de hexano (50 pares de glândulas – 1 ml de hexano) durante 20 dias, no refrigerador, para que as propriedades das glândulas tivessem uma maior absorção pelo solvente hexano, após isto os extratos foram obtidos através da maceração das glândulas armazenadas, com o auxílio do agitador (SILVA *et al.*, 2022).

Figura 3 - Extração da glândula metapleurais. (A) Espécimes crioanestesiadas. (B) Dissecação das glândulas. (C) Glândula metapleurais



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

3.2.2 Amostras dos microrganismos

Foram utilizadas cepas ATCC (American Type Culture Collection) adquiridas comercialmente, sendo elas *C. albicans* (ATCC 76485) e *P. aeruginosa* (ATCC 1705). A amostra do fungo foi reativada e cultivada em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA), e a amostra da bactéria reativada e cultivada em Ágar Tryptic Soy (TSA). Tais procedimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia das Doenças Infecciosas-LAMIDI da UEMA, *Campus* Caxias, onde também foram realizados os testes de suscetibilidade ao extrato da glândula metapleurais (SILVA *et al.*, 2022).

3.2.3 Preparo dos meios de cultura para reativação das cepas

Inicialmente foram preparadas um total de seis placas para o cultivo das cepas, sendo três para o microrganismo *C. albicans* e três placas para a bactéria *P. aeruginosa*. Para a composição do meio de cultura do fungo, as placas foram constituídas de uma camada de Ágar Sabouraud, sendo empregado 4,0 gramas do ágar diluído em 60 ml de água destilada. Para cultivo da bactéria, as placas foram formadas por uma camada de Tryptic Soy Agar (TSA), utilizando 3,0 gramas em 60 ml de água destilada.

Em seguida, as misturas foram agitadas e levadas ao micro-ondas para a dissolução total. Após isto, as soluções foram colocadas na autoclave à temperatura de 120°C pelo período

de 15 minutos. Depois da esterilização, os meios foram entornados nas placas devidamente esterilizadas, e postos em repouso para solidificação. Seguidamente, foi realizado a inoculação dos microrganismos, com o próprio swab do dispositivo umedecido na suspensão, sendo semeado nas placas, com o auxílio de uma alça estéril, foram feitas estrias para obter as colônias isoladas, as placas foram isoladas com papel filme e identificadas com nome e número da amostra, estes procedimentos foram feitos na capela de fluxo laminar em condições assépticas a fim de evitar contaminação das amostras. Após isto, as placas foram levadas a estufa e posicionadas de forma invertida sob condições e temperaturas apropriadas para cada microrganismos, pelo período de 24 horas (Figura 4 A, B e C) (SILVA *et al.*, 2022).

Figura 4 – Reativação dos microrganismos. (A) Inoculação nos meios de cultura. (B) Incubação em estufa. (C) Placas com microrganismos reativados



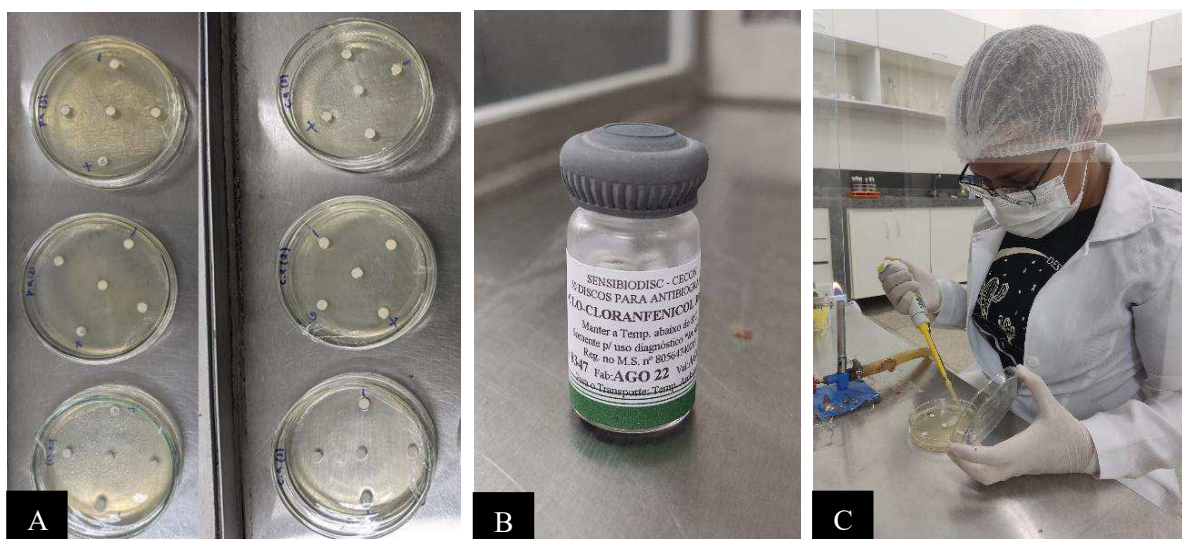
Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

3.2.4 Testes antimicrobianos pelo método de difusão em ágar

A preparação e os testes foram feitos em etapas, para cada microrganismo foram feitos 5 testes triplicatas, totalizando 15 amostras para o microrganismo *P. aeruginosa* e 15 para o fungo *C. albicans*. Em cada teste foram preparadas 3 placas para cada microrganismo, compostas por uma camada de Ágar Muller-Hinton (MHA), utilizando 4,3 gramas para 120 ml de água destilada, dissoluções adaptadas pela recomendação do fabricante. As misturas foram levadas ao micro-ondas para a dissolução total e após isto, as soluções foram colocadas na autoclave por um período de 15 minutos à temperatura de 120°C. Depois da esterilização, os meios foram colocados nas placas devidamente esterilizadas, e postos em repouso para solidificação.

Em cada placa foram inseridos discos estéreis para testes de suscetibilidade com o auxílio de uma pinça flambada e resfriada. Em ambas as amostras, três destes discos foram preenchido com 10µl da amostra do extrato da glândula metapleural. Para o controle positivo dos testes com o fungo, foi empregado 10µl de Fluconazol diluído, seguindo a padronização do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019). Nas placas com a bactéria, utilizou-se como controle positivo discos de antibiograma de Clo-Cloranfenicol 30 mcg, e solução fisiológica para controle negativo de ambos (Figura 5 A, B e C). Após o preparo, as placas foram levadas para incubação em estufa, por um período total de 48 horas.

Figura 5 – Preparo dos testes de suscetibilidade. (A) Placas com os discos estéreis. (B) Disco de Cloranfenicol 30 mcg. (C) Inserção do extrato da glândula e dos controles positivos e negativos.

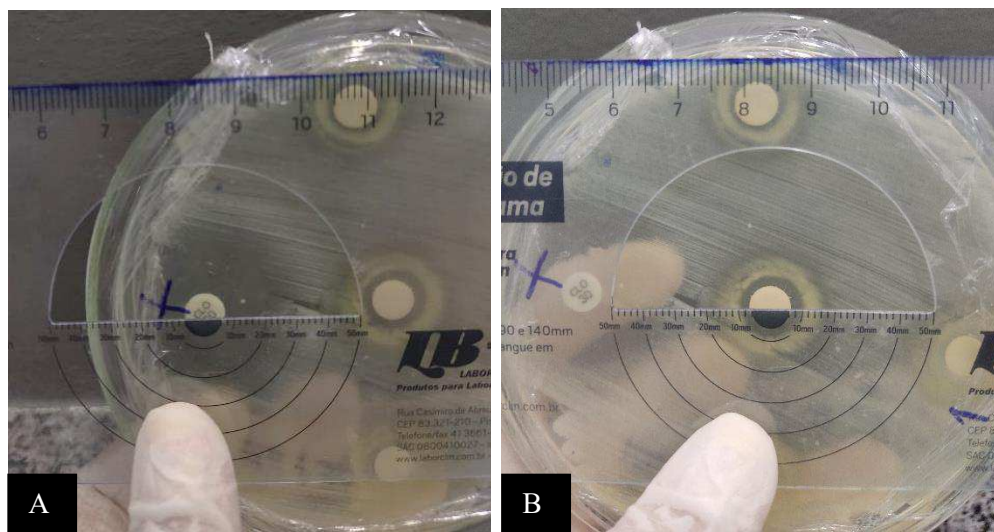


Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

3.2.5 Leituras dos dados

Para a leitura dos resultados foi realizado a identificação da presença de halos de inibição, visto que a atividade antimicrobiana e antifúngica é determinada pela inibição do crescimento das colônias dos microrganismos *P. aeruginosa* e *C. albicans* e representada por halos formados ao redor dos discos com o extrato da glândula metapleural, e em seguida os halos foram mensurados com o auxílio de uma régua de antibiograma (Figura 6).

Figura 6 – Mensuração dos halos de inibição em placas teste. (A) Halo do controle positivo. (B) Halo do extrato da glândula metapleural



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

A análise dos resultados foi realizada nos períodos de 24h e 48h, a partir do registro de presença e ausência dos halos de inibição sobre os microrganismos e leitura do diâmetro dos halos, sendo medido em milímetros (SILVA *et al.*, 2022).

Após a realização de todos os testes e das análises, os resultados obtidos foram tabelados no programa Excel, com dados numéricos e apresentados com figuras para melhor compreensão dos resultados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos através dos testes de suscetibilidade com o extrato da glândula metapleural de *P. clavata*, verificou-se que houve atividade antimicrobiana da secreção da glândula exócrina nos microrganismos, se manifestando com diversas variações entre as espécies *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Diante dos testes realizados, os valores de mensuração dos diâmetros dos halos foram mais indicativos na bactéria *P. aeruginosa*, com presença de mais de um halo por placa, e de diâmetros com mensuração >20 mm (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores dos diâmetros dos halos de inibição do extrato da glândula metapleural de *Paraponera clavata* sobre as cepas do microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*

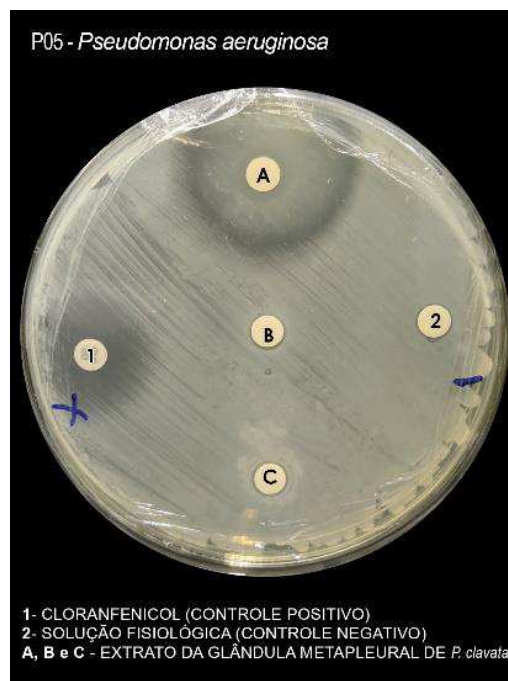
Espécie de Microrganismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Período de análise - Controle Positivo Cloranfenicol 30 mcg		Período de análise - Extrato da Glândula	
	24h	48h	24h	48h
AMOSTRA				
P01	-	-	5 mm	5 mm
P02	-	-	-	-
P03	12 mm	12 mm	-	-
P04	20 mm	20 mm	5 mm	5 mm
P05	20 mm	20 mm	25 mm	25 mm
P06	20 mm	20 mm	-	-
P07	20 mm	20 mm	-	-
P08	20 mm	20 mm	-	-
P09	-	-	-	-
P10	20 mm	20 mm	5 mm	5mm
P11	25 mm	25 mm	-	-
P12	25 mm	25 mm	10 mm; 5 mm	10 mm; 5 mm
P13	20 mm	20 mm	10 mm; 10mm	10 mm; 10 mm
P14	20 mm	20 mm	10 mm	10 mm
P15	20 mm	20 mm	10 mm	10 mm

(P) amostra; (-) Sem ação inibitória; (;) Mais de um halo por placa.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023

A atividade antimicrobiana da secreção glandular apresentou diversas variações sobre o microrganismo *P. aeruginosa*, manifestando halos de inibição com diâmetros entre 5 e 25 mm, com respostas significativas para as amostras *P12* e *P13*, onde apareceram mais de um halo por placa, nas placas *P13* - *P15* apresentando halos de 10 mm, e com resultado mais expressivo na amostra *P05* com halo de diâmetro de 25 mm (Figura 7), sendo superior ao halo do controle positivo Cloranfenicol.

Figura 7 – Análise da placa de *P. aeruginosa* com halo de inibição de 25 mm (ponto A)



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Apesar da intensificação das cepas na colônia após o período de 48h, as análises entre o intervalo de 24h e 48h não indicou nenhuma disparidade em relação aos diâmetros dos halos, permanecendo a mesma mensuração nos dois períodos, tanto no controle positivo quanto no extrato da glândula, ou seja, a secreção glandular manteve sua ação inibitória sobre o microrganismo por mais de 24h.

Das quinze placas analisadas nos testes de suscetibilidade, oito dessas amostras não indicaram halos de inibição, tanto para o controle positivo (*P01*, *P02* e *P09*), quanto nos extratos da glândula (*P02*, *P03*, *P06*, *P07*, *P08*, *P09* e *P11*), e apenas a amostra *P09* não manifestou nenhum halo de inibição.

Yek e Mueller (2011), aponta em sua literatura, estudos que confirmam a capacidade da secreção desta glândula diminuir os níveis de pH em fungos e em bactérias, visto que muitas bactérias são inibidas em baixos níveis de pH e os ácidos encontrados nesta glândula exócrina diminuem o pH no tegumento da formiga, sendo possível que no ambiente do ninho as formigas distribuem quantidades suficientes de secreções que inibem estes patógenos.

Ainda que os testes tenham apresentado variações na ação da glândula, os resultados evidenciaram o seu potencial antimicrobiano frente as cepas da espécie *P. aeruginosa*, manifestando ação inibitória em 53,33% dos testes.

Os testes antimicrobianos executados com as cepas do fungo *C. albicans* tiveram resultados poucos significativos em relação ao potencial da glândula, quando comparado aos testes realizados com *P. aeruginosa*, indicando halos de inibição com valores dos diâmetros inferiores ao que se esperava (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores dos diâmetros dos halos de inibição do extrato da glândula metapleural de *P. clavata* sobre as cepas do microrganismo *Cândida albicans*

Espécie de Microrganismo <i>Cândida albicans</i>	Período de análise - Controle Positivo Fluconazol		Período de análise - Extrato da Glândula	
	24h	48h	24h	48h
AMOSTRA				
C01	-	-	10 mm	10 mm
C02	-	-	-	-
C03	12 mm	12 mm	5 mm	5 mm
C04	10 mm	10 mm	-	-
C05	12 mm	12 mm	-	-
C06	10 mm	10 mm	-	-
C07	10 mm	10 mm	-	-
C08	12 mm	12 mm	-	-
C09	12 mm	12 mm	-	-
C10	-	-	-	-
C11	-	-	-	-
C12	5 mm	5 mm	-	-
C13	-	-	-	-
C14	20 mm	20 mm	-	-
C15	-	-	-	-

(C) amostra; (-) Sem ação inibitória; (;) Mais de um halo por placa.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023

A ação da secreção da glândula metapleural foi pouco significativa frente ao fungo da espécie *C. albicans*, expressando halos de inibição apenas em duas amostras (C01 e C03) com diâmetros de apenas 10 e 5 mm, respectivamente (Figura 8).

Figura 8 – Análise da placa de *C. albicans* com halo de inibição de 5 mm (ponto A)



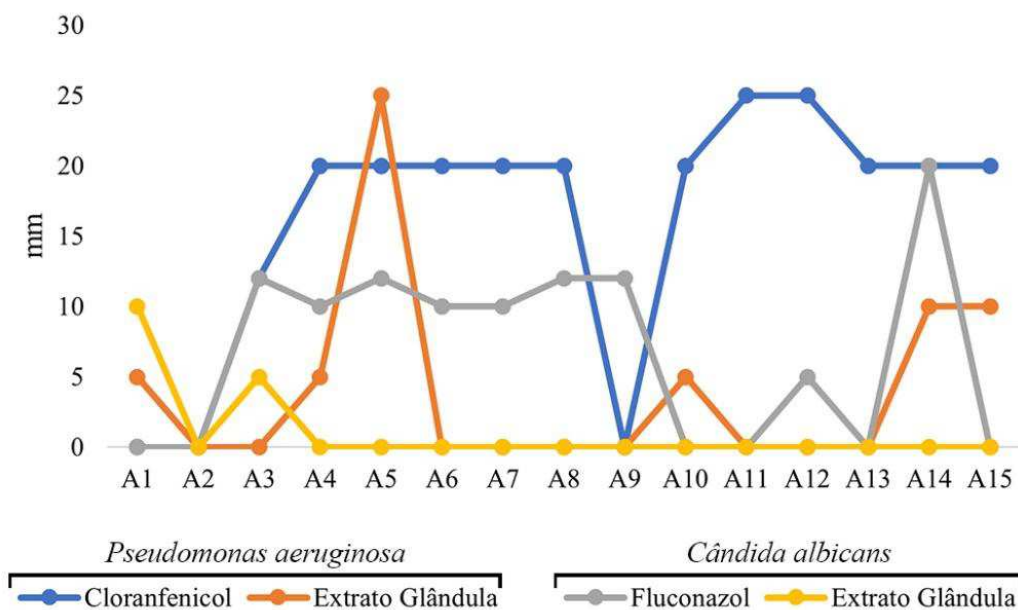
Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Além dos valores limitados de inibição, um fator importante a se analisar é também a insuficiência inibitória por parte do controle positivo (Fluconazol), onde em seis amostras não houve nenhuma ação por parte do fármaco.

Por serem microrganismos patógenos com alta possibilidade de criarem resistência a fármacos, a ausência de uma forte ação antimicrobiana pode ser explicada pela resistência a um baixo nível de concentração dos extratos do controle positivo e da secreção da glândula metapleural, visto que os valores dos diâmetros de todos os halos de inibição, sobre a espécie do fungo, em 66,6% das placas foram < 20 mm.

Para efeito comparativo, os resultados entre as duas espécies de microrganismos e a ação inibitória do controle positivo e do extrato da glândula metapleural, mostram diversas variações entre as amostras testadas no ensaio antimicrobiano, após o período de 48h de incubação (Figura 8).

Figura 9 – Gráfico comparativo das ações antimicrobiana sobre *P. aeruginosa* e *C. albicans* após 48h.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Observa-se que as ações de inibição tanto do controle positivo e do extrato da glândula, nas amostras A1 a A15, tiveram uma maior ação sobre a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, tendo picos iguais em halos de 25 mm, no controle positivo e extrato da glândula, e menor pico em 5 mm, no extrato da glândula. Já as ações inibitórias sobre o fungo *C. albicans* tiveram menores evidências, tendo seu maior pico em 20 mm, no controle positivo, e menor pico em 5 mm, onde havia o extrato da glândula.

Diante disto, bactéria *P. aeruginosa* foi o microrganismo que mais se inibiu frente aos extratos da glândula metapleurais de *P. clavata* e do controle positivo Cloranfenicol, e o fungo da espécie *C. albicans* teve uma maior resistência sobre os métodos de inibição das cepas, apresentando halos ≤ 20 mm.

Afirma-se que a concentração da quantidade de glândulas metapleurais é um fator que contribui para a atuação dessa defesa imunológica das colônias, uma grande concentração pode inibir o crescimento de fungos e uma baixa concentração pode propiciar o crescimento de fungos simbióticos (POWELL e STRADLING, 1986; YEK e MUELLER, 2011).

Silva *et al.* (2022), destaca em seu estudo que maiores concentrações da secreção da glândula metapleurais de *P. clavata* têm uma maior ação antisséptica sobre microrganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e sobre a levedura *C. albicans*,

apresentando em seus testes halos de 21 mm na levedura *C. albicans* na concentração de 120 glândulas, e halo de 22 mm na concentração de 150 glândulas.

Além disto, os mecanismos para a produção desta defesa imunológica contra microrganismos provavelmente envolvem condições particulares para cada espécie de formiga, atrelando às suas ações modos de comportamento, combinações químicas, morfologia da glândula e fatores externos.

Diversos estudos discutem os mecanismos desta defesa imunológica, a fim de compreender como as formigas podem se proteger através de suas próprias secreções da glândula metapleurar, certificando que as secreções podem se tornar ativas e prejudiciais somente após a exposição ao ambiente externo (MACKINTOSH, 1995; YEK e MUELLER, 2011).

As formigas conseguem atingir um grupo específico de potenciais patógenos havendo alteração de sensibilidade entre diferentes microrganismos ou entre os ciclos de vida do mesmo microrganismo, quando ajustado as concentrações relativas de seus compostos da glândula metapleurar (BOT *et al.*, 2002).

Resulta-se então, que a glândula metapleurar de *P. clavata* apresentou potencial antimicrobiano sobre os microrganismos patogênicos da espécie *Pseudomonas aeruginosa* e leveduras da espécie *Cândida albicans*, sendo mais expressivo nas amostras *P05*, *P12* e *P13* de *P. aeruginosa*, com halos superiores à do controle positivo, medindo 25 mm e mais de um halo por placa. E nas amostras *C01* e *C03* de *C. albicans*, com halo de 5 mm e 10 mm.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, conclui-se que as secreções da glândula metapleuraral de *Paraponera clavata*, apresenta potencial antimicrobiano, evidenciando ação inibitória sobre as cepas da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e sobre o fungo *Cândida albicans*. Com isto, as conclusões deste trabalho solidificam as respostas em relação ao potencial antimicrobiano da glândula metapleuraral de *P. clavata*. Ademais, é possível, que esse potencial antimicrobiano seja capaz de apresentar resultados ainda mais promissores se testado em concentrações superiores as avaliadas nesse estudo.

Os resultados obtidos nessa pesquisa são pioneiros, visto que até o momento há somente duas literaturas de Silva *et al.*, que utilizam especificamente a espécie *P. clavata* para identificar a ação antimicrobiana da sua glândula metapleuraral. Dessa forma, os resultados obtidos contribuem significativamente com outros estudos que abordam estes métodos de análises, pois ainda há uma lacuna nessa linha de pesquisa.

Trabalhos como este tem grande relevância científica e clínica, pois corrobora significativamente com diversas obras que analisam esta glândula, tanto em Formicidae como também em outros insetos, além de fundamentar estudos acerca dos microrganismos patogênicos como *C. albicans* e *P. aeruginosa*. Dessa forma, sugere-se que pesquisas como estas sejam continuadas, como o uso de novas metodologias e diferentes cepas, visto que já vem apresentando resultados promissores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. M.M. *et al.* Um estudo comparativo de química da glândula exócrina em *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex* formigas cultivadoras de fungos. **Sistemática Bioquímica e Ecologia**, 2012.

AntWeb, Versão 8.87. California Academy of Science, 2023. Disponível em: <https://www.antweb.org>. Acesso em 20 de dezembro de 2023.

BILLEN, J. Diversidad y morfología de las glándulas exocrinas en las hormigas. **Hormigas de Colombia; Fernández, F., Guerrero, RJ, Delsinne, T., Eds**, 2019.

BILLEN, J.; AL-KHALIFA, B.; SILVA, R. Pretarsus structure in relation to climbing ability in the ants *Brachyponera sennaarensis* and *Daceton armigerum*. **Saudita Journal of Biological Sciences**, 2017.

BOT, A. N. M. *et al.* Variable Sensitivity of Fungi and Bacteria to Compounds Produced by the Metapleural Glands of Leaf-Cutting Ants. **Insectes Sociaux**, 2002.

CANUTO, M. M.; RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet infectious diseases**, 2002.

CLSI. When Should Antifungal Susceptibility Testing Be Performed For *Candida* Species Isolated From Clinical Specimens?. **The Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2019. Disponível em: <https://clsi.org/>. Acesso em 19 nov. 2022.

CURRIE, C. R. *et al.* Criptas coevoluídas e glândulas exócrinas suportam bactérias mutualísticas em formigas produtoras de fungos. **Ciência**, 2006.

DEORUKHKAR, S. C.; ROUSHANI, S. Identification of *Candida* species: conventional methods in the era of molecular diagnosis. **Ann Microbiol Farmacognosia**, 2018.

WANG, D. *et al.* Um Caso de Herpes Zoster Gangrenoso Complicado com Infecção por *Candida albicans*. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, 2023.

GUARDA, C.; LUTINSKI, J. A. Glandular Secretions of Ants (Hymenoptera: Formicidae): A Review on extraction, chemical characterization and antibiotic potential. **Sociobiologia**, 2020.

HOLLOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990.

JURADO-MARTÍN, I.; SAINZ-MEJÍAS, M.; MCCLEAN, Siobhán. *Pseudomonas aeruginosa*: Um patógeno audacioso com um arsenal adaptável de fatores de virulência. **Jornal internacional de ciências moleculares**.

KAMIMURA, H. M.; CALDEIRA, S. M.; AVILA, M. A. G. Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: uma abordagem retrospectiva. **Revista SOBECC**, 2013.

KOLLEF, M. H. Gram-negative bacterial resistance: evolving patterns and treatment paradigms. **Clinical Infectious Diseases**, 2005.

LOCKHART, G. J. **Formigas e outros grandes remédios**. parcialmente publicado online por AL Jacobson, 2007.

MASCHWITZ, Ulrich. Estudos comparativos sobre a função da glândula metapleural em formigas. **Oecologia**, 1974.

PENICK, C. *et al.* External immunity in ant societies: sociality and colony size do not predict investment in antimicrobials. **Royal Society Open Science**, 2018.

PEREIRA, M. C. **O papel das secreções das formigas-cortadeiras na defesa da colônia**. Repositório Institucional UNESP, 2019.

PEREIRA, P. B. *et al.* **Análise Multitemporal do Uso e Cobertura da Terra na Área de Proteção Ambiental Municipal (APA) do Inhamum, Nordeste Do Brasil**. XVI Encontro Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Geografia, 2021.

POWELL, RJ; STRADLING, DJ. Factors influencing the growth of *Attamyces bromatificus*, a symbiont of attine ants. **Transactions of the British Mycological Society**, 1986.

RANG, H. P. *et al.* Rang e Dale: **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

SANTANA, P. S., *et al.* Efeito antibacteriano e antifúngico de extratos etanólico, hexânico e metanólico a partir de folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Malva corama) contra cepas multi-resistentes a drogas. **Biota Amazônia, Macapá**, 2016.

SILVA, G. *et al.* Trilhas Ecológicas da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum e seus Aspectos Florísticos, Maranhão, Brasil. **Agrarian Academy**, 2016.

SILVA, L. *et al.* Atividade de extração metapleural de *Paraponera clavata* (fabricius, 1775) (formicidae: paraponerinae) frente a bactérias e de levedura do gênero *Candida*. **International Journal of Development Research Jornal Internacional de Pesquisa em Desenvolvimento**, 2022.

SILVA, M.; AQUINO, S. Antimicrobial resistance: a review of the challenges in the search for new treatment alternatives. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, 2018.

SOUZA, K. R.; KERBAUY, M. T. M. Abordagem quanti-qualitativa: superação da dicotomia quantitativa-qualitativa na pesquisa em educação. **Educação e Filosofia**, 2017.

TRAGUST, S. External immune defence in ant societies (Hymenoptera: Formicidae): the role of antimicrobial venom and metapleural gland secretion. **Myrmecological News**, 2016.

TRANter, C.; FERNANDEZ-MARIN, A.; HUGHES, W. O. H. Quality and quantity: transitions in the use of antimicrobial glands for parasite defense. **Ecology and Evolution**, 2015.

ULMER, J. M. *et al.* 'Glândulas sociais' em parasitoides? – evolução convergente das glândulas metapleurais em Hymenoptera. **Insect Systematics and Diversity**, 2023.

VIEIRA, A. S. *et al.* "Chemical composition of metapleural gland secretions of fungus-growing and non-fungus-growing ants." **Journal of chemical ecology**, 2012.

WANG, C. *et al.* Morfologia da Nova Glândula Basimandibular nas Formigas do Gênero *Strumigenys* (Hymenoptera, Formicidae). **Insetos**, 2021.

YEK, S. H. e MUELLER, U. G. The metapleural gland of ants. **Biological Reviews**, 2011.