

TARCÍSIO MARCOS MACEDO MOTA FILHO

**CONTROLE DA FORMIGA CORTADEIRA, *Atta sexdens* (HYMENOPTERA:
FORMICIDAE), UTILIZANDO INSETICIDAS: ESTUDO SOBRE OS MECANISMOS
COMPORTAMENTAIS**

Botucatu

2022

TARCÍSIO MARCOS MACEDO MOTA FILHO

**CONTROLE DA FORMIGA CORTADEIRA, *Atta sexdens* (HYMENOPTERA:
FORMICIDAE), UTILIZANDO INSETICIDAS: ESTUDO SOBRE OS MECANISMOS
COMPORTAMENTAIS**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Agronômicas
da Unesp Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em
Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Luiz Carlos Forti

Botucatu

2022

M917c

Mota Filho, Tarcísio Marcos Macedo

Controle da formiga cortadeira, *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), utilizando inseticidas: Estudo sobre os mecanismos comportamentais / Tarcísio Marcos Macedo Mota Filho. -- Botucatu, 2022

76 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientador: Luiz Carlos Forti

1. Atta. 2. Dispersão de Inseticidas. 3. Interações sociais. 4. Rotas de contaminação. 5. Trofalaxia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

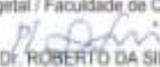
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CONTROLE DA FORMIGA CORTADEIRA, *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE), UTILIZANDO INSETICIDAS: ESTUDO SOBRE OS MECANISMOS COMPORTAMENTAIS

AUTOR: TARCISIO MARCOS MACEDO MOTA FILHO

ORIENTADOR: LUIZ CARLOS FORTI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LUIZ CARLOS FORTI (Participação Virtual)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu - UNESP


Pesquisador Dr. ROBERTO DA SILVA CAMARGO (Participação Virtual)
Entomologia Agrícola /


Prof. Dr. CARLOS ALBERTO OLIVEIRA DE MATOS (Participação Virtual)
Coordenadoria de Engenharia Industrial Madeireira / Campus de Itapeva - Unesp

Botucatu, 11 de outubro de 2022

À minha família, dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser essencial em minha vida, pela paciência e sabedoria que sempre me concedeu para enfrentar as lutas.

Aos meus queridos pais, Marly Natalia Gonçalves Mota e Tarcísio Marcos Macedo Mota (in memoriam), pelos incentivos e valores passados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Proteção de Plantas da Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Botucatu, pela oportunidade.

Ao Dr. Roberto da Silva Camargo por todo conhecimento transmitido, auxílio na realização dos experimentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Oliveira de Matos (UNESP – Campus de Itapeva) pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos membros do Laboratório de Insetos-Praga (LISP), em especial, Luís Eduardo Pontes Stefanelli e Roberto da Silva Camargo, pela convivência diária e amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Forti, pela orientação, ensinamentos, paciência e exemplo de professor.

A todos os professores e funcionários da FCA.

Aos meus amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão dessa dissertação.

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

RESUMO

As formigas cortadeiras do gênero *Atta*, *Acromyrmex* e *Amoimyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) são consideradas importantes pragas de plantios florestais, da agricultura e pecuária. Isca tóxica contendo o princípio ativo sulfluramida ou fipronil é o principal método de controle destes insetos. Contudo, ainda sabe-se pouco sobre como ocorre a dispersão do inseticida no interior da colônia, se por trofalaxia entre as operárias da colônia, ou se seus comportamentos de autolimpeza, limpeza mútua, bem como o contato entre operárias contaminadas e não contaminadas proporcionam a dispersão. O objetivo do estudo foi determinar se os comportamentos de autolimpeza, limpeza mútua, ou toque entre operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) dispersa os inseticidas fipronil e sulfluramida entre os membros de um grupo ou colônia. Para isso esses inseticidas foram aplicados topicamente em operárias e as interações entre operárias contaminadas e não contaminadas, a nível de grupo e de colônia foram estudadas. Com o aumento do tamanho do grupo ou de operárias contaminadas na colônia, a frequência de interações entre operárias aumentou, sendo o toque o comportamento mais frequente. Os inseticidas foram transmitidos por contato direto entre as operárias, seguido de auto-limpeza e limpeza mútua. Esses comportamentos foram responsáveis pela rápida dispersão dos inseticidas entre os membros do grupo ou colônia. Os resultados, portanto, sustentam a hipótese de que as interações sociais promovem a contaminação e dispersão de inseticida entre membros de um grupo ou colônia.

Palavras-chave: *Atta*; dispersão de Inseticidas; interações sociais; rotas de contaminação; trofalaxia.

ABSTRACT

Leaf-cutting ants of the genus *Atta*, *Acromyrmex* and *Amoimyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) are considered important pests of forest plantations, agriculture and livestock. Toxic bait containing the active ingredient sulfluramid or fipronil is the main method of controlling these insects. However, little is known about how the insecticide is dispersed within the colony, whether by trophallaxis between colony workers, or if their self-cleaning and mutual cleaning behaviors, as well as the contact between contaminated and uncontaminated workers, provide the dispersal. The objective of the study was to determine whether self-cleaning, mutual cleaning, or touching behaviors among *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) workers disperses the insecticides fipronil and sulfluramid among members of a group or colony. For this, these insecticides were applied topically on workers and the interactions between contaminated and uncontaminated workers, at the group and colony level, were studied. With the increase in the size of the group or contaminated workers in the colony, the frequency of interactions between workers increased, with touch being the most frequent behavior. The insecticides were transmitted by direct contact between workers, followed by self-cleaning and mutual cleaning. These behaviors were responsible for the rapid dispersion of insecticides among the members of the group or colony. The results, therefore, support the hypothesis that social interactions promote insecticide contamination and dispersion among members of a group or colony.

Keywords: *Atta*; Insecticide dispersion; social interactions; contamination routes; trophallaxis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1 – Rotas de contaminação e mortalidade da formiga cortadeira, *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), pelos inseticidas fipronil e sulfluramida por meio de interações sociais

- Figura 1 - Atos comportamentais realizados por operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae): (A) toque; (B) auto-limpeza; (C) limpeza mutua; (D) toque 2; (E) auto-limpeza 2; e (F) limpeza mutua 2.....28
- Figura 2 - Curvas de sobrevivência dos grupos de operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) no controle e com os inseticidas fipronil e sulfluramida a 0,1% e 1,0%.....34

Capítulo 2 – Comportamento de limpeza mútua, autolimpeza e toque como um mecanismo para dispersar inseticidas dentro das colônias de uma formiga cortadeira

- Figura 1 - Frequência de comportamentos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) com aplicação tópica de duas concentrações dos inseticidas fipronil (Fip.) E sulfluramida (Sulf.) e o respectivo controle. Não há diferenças entre as medianas dos tratamentos e seus respectivos controles. As medianas seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de soma de postos de Wilcoxon aos pares com o ajuste dos valores P ($\alpha = 0,05$). Comportamentos: (1) auto-limpeza; (2)50
- Figura 2 - Frequência de comportamentos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) durante o preparo de iscas tóxicas com os inseticidas fipronil e sulfluramida e o controle, para incorporação no jardim de fungo. As medianas seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de soma de postos de Wilcoxon aos pares com o ajuste dos valores P ($\alpha = 0,05$). Comportamentos: (1) transportar do pellet; (2) segurar o pellet; (3) lamben o pellet; (4) fragmentar o pellet; (5) incorporar do pellet; (6) auto-limpeza; (7) limpeza mútua; e (8) total.....51
- Figura 3 - Curvas de sobrevivência de colônias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em função de diferentes concentrações (aplicação tópica (T) e iscas tóxicas (I)) com inseticidas fipronil ou sulfluramida.....52

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 – Rotas de contaminação e mortalidade da formiga cortadeira, *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), pelos inseticidas fipronil e sulfluramida por meio de interações sociais

- Tabela 1 – Frequências comportamentais (média \pm erro padrão) de grupos dentro das categorias comportamentais encontradas em operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)29
- Tabela 2 – Frequência de atos comportamentais (média \pm erro padrão) dentro dos grupos de operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)30
- Tabela 3 – Modelo de regressão logística da frequência de operárias vivas e mortas de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) com diferentes formulações de inseticidas e o grupo de indivíduos31
- Tabela 4 – Comparação múltipla entre mortalidade média marginal (média \pm erro padrão) (Mortalidade) e os limites inferior (LIA) e superior (LSA) assintóticos para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em função de diferentes inseticidas.....31
- Tabela 5 – Comparação múltipla entre as estimativas de mortalidade média marginal (média \pm erro padrão) (Mortalidade) e os limites inferior (LIA) e superior (LSA) assintóticos para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em função de diferentes grupos de operárias.....32
- Tabela 6 – Valor *P* das comparações múltiplas das curvas de sobrevivência para grupos de operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) contaminados com os inseticidas fipronil (Fip.) e sulfluramida (Sulf.)33

Capítulo 2 – Comportamento de limpeza mútua, auto-limpeza e toque como um mecanismo para dispersar inseticidas dentro das colônias de uma formiga cortadeira

- Tabela 1 – Número de operárias mortas (número de mortas), massa de operárias mortas (massa de mortas) e massa de resíduos em colônias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) que receberam as duas concentrações (iscas tóxicas (I) e aplicação tópica (T)) com os inseticidas fipronil e sulfluramida. As medianas seguidas por letras diferentes por coluna diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$)53

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	19
CAPÍTULO 1 - Rotas de contaminação e mortalidade da formiga cortadeira, <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae), pelos inseticidas fipronil e sulfluramida por meio de interações sociais.....	22
1.1 INTRODUÇÃO.....	23
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
1.2.1 Colônias estudadas	25
1.2.2 Experimento 1	25
1.2.3 Experimento 2	26
1.2.4 Análise de dados	27
1.3 RESULTADOS.....	28
1.3.1 Experimento 1	28
1.3.2 Experimento 2	31
1.4 DISCUSSÃO.....	34
1.5 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 2 – Comportamento de limpeza mútua, autolimpeza e toque como um mecanismo para dispersar inseticidas dentro das colônias de uma formiga cortadeira.....	43
2.1 INTRODUÇÃO.....	45
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.2.1 Colônias estudadas	46
2.2.2 Configuração experimental	47
2.2.3 Experimento	48
2.2.4 Análise estatística	48
2.3 RESULTADOS.....	49
2.4 DISCUSSÃO.....	53
2.4.1 Aplicação tópica	53
2.4.2 Aplicação isca	54
2.4.3 Comparação aplicação tópica vs. Isca	56

REFERÊNCIAS	58
ANEXO	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
REFERÊNCIAS	75

INTRODUÇÃO GERAL

As formigas surgiram por volta de 115 a 135 milhões de anos atrás (BRADY et al., 2006). Pertencem à família Formicidae, ordem Hymenoptera e representam o mais abundante e diverso grupo animal do ecossistema tropical, com mais de 24.000 espécies que estão agrupadas em 23 subfamílias (BOLTON et al., 2007), das quais cerca de 12.500 espécies já são descritas (WARD, 2010). Somente no Brasil, há cerca de 2.500 espécies (CASTRO, 2014).

A família Formicidae é dividida em várias subfamílias. Dentre elas está a subfamília Myrmicinae que compreende as formigas da tribo Attini. A principal característica dessa tribo é o ato de cultivarem um fungo simbiote do qual se alimentam, mantendo assim uma relação de simbiose obrigatória (SILVA et al., 2003). Atualmente, existem mais de 17 gêneros e 246 espécies de formigas cultivadoras de fungos catalogados pertencentes a tribo Attini (BOLTON, 2007). Estima-se que o hábito de cultivo de fungo ocorra há cerca de 50 milhões de anos (SCHULTZ; BRADY, 2008), e o *Leucocoprinus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) é o principal fungo simbiote cultivado pelas formigas (FISHER; STRADILING; PEGLER, 1994).

As formigas da tribo *Attini* possuem origem nas regiões tropicais, possivelmente ao Norte da América do Sul, mais especificamente na região amazônica (WEBER, 1972). No entanto, encontram-se presentes em quase todo o continente americano, desde o centro da Argentina, seguindo por todos os países da América do Sul (exceto no Chile) e continuando pela América Central (exceto em algumas ilhas das Antilhas) até o sul dos Estados Unidos da América (WEBER, 1970). Devido à sua alta capacidade adaptativa elas possuem ocorrência nos mais diversos tipos de ambientes, desde desertos, até florestas tropicais (WEBER, 1972; SOLOMON et al., 2008), exceto em algumas ilhas oceânicas e locais com grandes altitudes (WARD, 2010).

Entre as espécies de importância econômica, estão as formigas cortadeiras que pertencem aos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (*quenquéns*) e *Amoimyrmex* (CRISTIANO et al., 2020). As formigas cortadeiras são consideradas pragas nos setores agrícola, pecuária e floresta, e se destacam principalmente, pelo desfolhamento que causam ao cortarem e carregarem as partes vegetais das plantas cultivadas (GARCIA et al., 2003), que após processadas servem de substrato para o fungo simbiote, *Leucocoprinus gongylophorus* (MUELLER et al., 2018), utilizado

como principal fonte de alimentação da colônia (DELLA LUCIA, 2011).

Atualmente, o controle químico com iscas tóxicas é considerado um dos mais eficientes no controle de formigas cortadeiras; entretanto, existe a importância de o inseticida matar em baixas concentrações (BOARETTO; FORTI, 1997; BRITTO et al., 2016). Além disso, é importante que o ingrediente ativo possua particularidades como: agir por ingestão; ser inodoro e não ser repelente às formigas cortadeiras; ser de ação tóxica retardada, com mortalidade menor que 15% após o primeiro dia e maior que 90% no 21º; ser letal em baixas concentrações; deve ser uma combinação do princípio ativo e um substrato atrativo e; não causar danos ambientais (NAGAMOTO et al., 2004; NYAMUKONDIWA; ADDISON, 2011).

Durante o processamento da isca, as operárias entram em contato com o inseticida e inicia o processo de contaminação (FORTI et al., 1993, 2007). Após a hidratação dos pellets, depositados sobre o jardim de fungo, as operárias começam a picá-los e incorporá-los. O processo de incorporação pode iniciar seis horas após a oferta das iscas e prolongar até 18 horas após (FORTI et al., 1993, 2007). Durante o processamento, 70% das operárias ficam contaminadas com o inseticida, comprovado através da utilização de um corante traçador (FORTI et al., 2007).

No entanto, ainda assim discute-se como ocorre a contaminação das formigas cortadeiras e a dispersão do inseticida na colônia. A contaminação através do contato direto com os inseticidas consiste nos comportamentos realizados pelas operárias envolvidas na manipulação do substrato durante o seu preparo e incorporação no jardim de fungo (BRITTO et al., 2016; CAMARGO et al., 2017), ocorrendo principalmente nas operárias médias através do comportamento de lambem o pellet (ANDRADE et al., 2002). Ainda as operárias podem ser contaminadas pelo contato indireto, ou seja, na limpeza, por “allogrooming” ou “self-grooming” (ANDRADE et al., 2002; CAMARGO et al., 2017), ou por ingestão e, posteriormente, por trofalaxia (MOREIRA et al., 2006, 2015).

A trofalaxia em formigas cortadeiras é relatada em alguns estudos, porém ainda é um assunto que gera discussão e um comportamento que necessita de esclarecimentos (ANDRADE et al., 2002); pois, provavelmente, durante o processo de trofalaxia oral há a diluição do ingrediente ativo.

Deste modo, o objetivo foi estudar os mecanismos de contaminação com operárias da formiga cortadeira – *Atta sexdens*, por meio de estudos

comportamentais, buscando esclarecer como ocorre a dispersão e a contaminação com diferentes ingredientes ativos na colônia

CAPÍTULO 1

Rotas de contaminação e mortalidade da formiga cortadeira, *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), pelos inseticidas fipronil e sulfluramida por meio de interações¹

Tarcísio M M Mota Filho, ^a Roberto S Camargo, ^a José C Zanuncio, ^b Luis E P Stefanelli, ^a Carlos A O de Matos ^c e Luiz C Forti ^a

^a Laboratório de Insetos Sociais Pragas, Departamento de Proteção de plantas, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil

^b Departamento de Entomologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Brasil

^c Campus Experimental de Itapeva, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Itapeva, Brasil

Mota Filho, T. M. M., Camargo, R. S., Zanuncio, J. C., Stefanelli, L. E. P., de Matos, C. A. O., Forti, L. C. Contamination routes and mortality of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) by the insecticides fipronil and sulfluramid through social interactions. **Pest Management Science**, v. 77, p. 4411–4417, 2021. Doi.org/10.1002/ps.6475

Resumo

FUNDAMENTO: As formigas cortadeiras (FCs) dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) são importantes pragas de plantações florestais, agricultura e pecuária. Iscas tóxicas contendo os ingredientes ativos fipronil ou sulfluramida são o principal método usado para controlar FCs. A dispersão do inseticida entre os membros de uma colônia de FC durante o controle com isca tóxica não é bem compreendida. O objetivo do estudo foi determinar se os comportamentos de autolimpeza, limpeza mútua, ou toque entre operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) dispersa os inseticidas fipronil e sulfluramida entre os membros da colônia. Os inseticidas foram aplicados topicamente em grupos de

¹ Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico **Pest Management Science**, onde foi publicado.

operárias de *A. sexdens* e interações sociais entre formigas com e sem inseticida e mortalidade em grupo foram avaliadas.

RESULTADOS: A análise comportamental mostrou um aumento da interação entre operárias de FCs à medida que o número de indivíduos aumentava, sendo os toques entre as operárias o comportamento mais frequente. A frequência de comportamentos observados foi maior nos grupos tratados com sulfluramida em comparação com fipronil. A mortalidade dos grupos tratados com fipronil foi quase duas vezes maior em comparação com as formigas tratadas com sulfluramida. Os inseticidas são provavelmente dispersos por toques excessivos entre as operárias e subsequente pela autolimpeza e limpeza mútua.

CONCLUSÃO: Esses comportamentos foram responsáveis pela rápida dispersão dos inseticidas entre os membros da colônia. A corroboração da hipótese de que as interações sociais contaminam as companheiras de colônia e é um modelo para estudos futuros sobre a contaminação de formigas com os ingredientes ativos inseticidas.

Palavras-chave: *Atta*; inseticidas; interações sociais; trofalaxia.

1.1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras (FCs) dos gêneros *Atta* Fabricius, 1805 e *Acromyrmex* Mayr, 1865 (Hymenoptera: Formicidae) são pragas importantes em florestas, áreas agrícolas e pastagens no Brasil e em outros países da região Neotropical.^{1,2} As FCs são controladas com iscas tóxicas contendo os ingredientes ativos fipronil ou sulfluramida; essas iscas possuem alta eficiência e viabilidade econômica e operacional.³⁻⁵ As iscas tóxicas consistem em uma mistura de um ingrediente ativo dissolvido em óleo de soja e incorporado em um substrato atrativo (polpa cítrica desidratada).⁶

Iscas tóxicas são comumente usadas para controlar FCs, mas a dispersão do inseticida que elas contêm entre os membros de uma colônia de FCs é pouco compreendida.⁷ Aproximadamente 50% das operárias de uma colônia são contaminadas diretamente durante o processamento de iscas tóxicas para incorporação no jardim de fungo,⁸ mas a forma como os inseticidas são dispersos dentro da colônia não é conhecida com precisão.

Formigas contaminadas podem dispersar o inseticida por trofalaxia.⁹⁻¹² Esse processo é amplamente encontrado em insetos sociais, como formigas, abelhas, cupins e vespas, e é definido como a distribuição do alimento líquido ingerido durante o forrageamento entre os membros de uma colônia por meio de regurgitação oral ou anal.¹³⁻¹⁵ Além disso, a trofalaxia desempenha um papel importante na troca de organismos simbiotes, feromônios, informações entre os indivíduos da colônia e na transmissão de substâncias tóxicas e patógenos.^{14,16} Operárias menores do FC *Acromyrmex subterraneus subterraneus* fornecem alimento líquido para operárias do mesmo tamanho e maiores que elas por meio da trofalaxia.¹⁷ A trofalaxia é conhecida por dispersar os inseticidas clorpirifós, cipermetrina e clordano entre grupos de trabalhadores do cupim subterrâneo *Coptotermes formosanus*.¹⁸

A trofalaxia é amplamente discutida para FCS e é um tema controverso entre os mirmecologistas. As taxas de trofalaxia são altamente variáveis entre as espécies de formigas e refletem sua posição filogenética e hábitos alimentares.¹⁹ Operárias de espécies de formigas que se alimentam de néctar e melado de pulgões, *Camponotus rufipes* (Formicidae) e *Pachycondyla villosa* (Ponerinae), coletam líquidos em altas taxas de ingestão, enquanto a FCs *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae) e formigas predadoras de o *Rhytidoponera* faz isso em taxas mais baixas.²⁰

As baixas taxas de ingestão de líquidos por FCs refletem outras estratégias de forrageamento. Operárias de *Atta sexdens rubropilosa* coletam folhas para cultivar seus fungos e ingerem líquidos derramados durante o corte e processamento das folhas, raramente visitando fontes de néctar.^{21,22} FCs ingerem líquidos durante a mastigação das folhas e a coleta dos gongilídios no jardim do fungo, mas não estão adaptados para armazenar grandes volumes de líquido.²³ A taxa de ingestão de líquidos para operárias de *C. rufipes* é de $6,7 \mu\text{l min}^{-1}$, muito maior do que para operárias de *A. sexdens*, que é inferior a $0,6 \mu\text{l min}^{-1}$.²⁰ Portanto, a trofalaxia pode ser incomum ou ausente em FCs.

A trofalaxia não é o comportamento de dispersão de inseticidas mais comum em uma colônia de FC. A intoxicação nessas formigas ocorre pelo contato direto com iscas tóxicas durante o processamento e incorporação no jardim de fungo, pelos comportamentos higiênicos como a autolimpeza e limpeza mútua, e pelo contato entre operárias contaminadas e não contaminadas.^{24,7,25-27} A trofalaxia oral em FCs é

muito inconsistente e não é um método confiável de troca de substâncias entre companheiras de colônia.

Diante disso, como as operárias são contaminadas? Primeiro, postulou que pelo contato direto com iscas tóxicas durante o cultivo do fungo. Outra hipótese sugere que pelo contato indireto com o princípio ativo, durante autolimpeza, limpeza mútua e toques entre as operárias. Para testar essas hipóteses, foi realizado um experimento com grupos de operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). Os inseticidas fipronil e sulfluramida, comumente usados no controle de FCs, foram aplicados topicamente nas operárias e foram estudadas as interações sociais entre operárias com e sem inseticida e a mortalidade dentro dos grupos.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Colônias estudadas

Sessenta colônias de *A. sexdens*, com aproximadamente seis meses de idade, coletadas em março de 2020 em Botucatu, São Paulo, Brasil, foram utilizadas em uma série experimental no Laboratório de Insetos Sociais-Pragas da Universidade Estadual Paulista. Cada colônia foi mantida em um recipiente (comprimento: 15 cm, largura: 15 cm e altura: 15 cm) com um jardim de fungo e alimentada com *Acalypha* spp. (folhas e caules). As colônias foram mantidas a $24 \pm 2^\circ$ C, 80% de umidade relativa (UR) e fotoperíodo de 12:12 h.

1.2.2 Experimento 1

Este experimento testou a hipótese de que as interações das formigas dispersam os inseticidas dentro da colônia. Essa hipótese foi testada usando 1,0 μ l dos inseticidas fipronil e sulfluramida aplicados topicamente na concentração de 0,1% (p/p) no pronoto de uma operária; foram avaliadas as interações sociais entre operárias contaminadas e não contaminadas. As operárias foram colocadas em recipientes plásticos de 250 ml com 1,0 cm de gesso no fundo e uma câmara acima do aparelho por um período de 24 horas. ⁷ O delineamento experimental constituiu de oito tratamentos com três repetições, sendo:

- **Grupo 1:1** - 1 operária + 1 operária com inseticida sulfluramida (0,1%);
- **Grupo 4:1** - 4 operárias + 1 operária com inseticida sulfluramida (0,1%);
- **Grupo 9:1** - 9 operárias + 1 operária com inseticida sulfluramida (0,1%);
- **Grupo 19:1** - 19 operárias + 1 operária com inseticida sulfluramida (0,1%).
- **Grupo 1:1** - 1 operária + 1 operária com inseticida fipronil (0,1%);
- **Grupo 4:1** - 4 operárias + 1 operária com inseticida fipronil (0,1%);
- **Grupo 9:1** - 9 operárias + 1 operária com inseticida fipronil (0,1%);
- **Grupo 19:1** - 19 operárias + 1 operária com inseticida fipronil (0,1%).

As operárias foram removidas das colônias usando uma pinça e selecionados de acordo com seu tamanho, com base no comprimento da cabeça de 1,2–2,2 mm (operárias de tamanho médio). O pronoto das operárias a serem contaminados foi marcado com um pequeno ponto de tinta confeccionado com caneta de coloração branca (Edding®) devido às propriedades da tinta de excelente aderência, secagem rápida e boa visibilidade. ²⁸ As operárias marcadas foram mantidas por 2 horas em recipientes plásticos de 350 ml, cujas bordas foram untadas com Fluon (resina de fluoroetileno) para evitar que as formigas escapassem. Um total de 1,0 µl de inseticida foi aplicado topicamente no pronoto da operária, de acordo com cada grupo, por meio de uma micro-seringa Hamilton TM (5,0 µl) e as formigas foram liberadas em seus respectivos grupos. As frequências de autolimpeza, limpeza mútua e toque entre operárias foram registradas durante 24 horas de gravação.

1.2.3 Experimento 2

Este experimento foi realizado para estudar a mortalidade de operárias contaminadas e não contaminadas. Foi utilizado um tratamento controle constituído de uma solução de óleo vegetal e duas concentrações de inseticida 0,1% e 1,0% (p/p). Cada operária marcada e contaminada foi colocada com seu grupo em um recipiente plástico transparente (7,5 cm de diâmetro e 5,5 cm de altura) contendo 1,0 cm de gesso no fundo para manter a umidade, que posteriormente foi hermeticamente fechado com tampas. A operária contaminada e seu grupo de indivíduos não contaminados ficaram sem alimento por 24 horas. Após este tempo, as formigas receberam aproximadamente 3,0 g de jardim de fungo e cerca de 20 operárias

jardineiras (comprimento da cabeça $\leq 0,8$ mm). Estas foram adicionadas porque as operárias médias não cuidam eficientemente do jardim de fungo.²⁹ A mortalidade foi avaliada aos 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17 e 21 dias, seguindo o protocolo estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ Departamento de Controle de Pragas.^{30,31}

1.2.4 Análise de dados

A frequência de comportamentos para diferentes grupos de indivíduos foi modelada usando um modelo linear generalizado (GLM) com variância gama e uma função de ligação inversa. Um modelo de regressão logística da frequência de operárias vivas e mortas com diferentes formulações de inseticidas e as proporções de indivíduos que receberam as formulações (fipronil, sulfluramida e controle) foi testado usando um GLM Bayesiano com variância binomial e função de ligação logit.

³²

Testes de comparação múltipla entre as médias marginais estimadas das variáveis de resposta (frequência comportamental e mortalidade) dentro dos níveis das variáveis preditoras (atos comportamentais, proporções e formulações) foram realizados usando um log de odds ratio. Um ajuste do valor P foi feito usando o método de Tukey para comparar uma família com n (número de níveis de um fator) estimativas.

A mortalidade das operárias foi corrigida usando a fórmula de Abbott³³ para subtrair o efeito da mortalidade natural e unificar os resultados entre os testes. A função de sobrevivência foi calculada usando o estimador de Kaplan-Meier (também conhecido como o estimador de limite do produto).³⁴ Este estimador é uma adaptação da função de sobrevivência empírica:

$S(t)$ = número de indivíduos que sobreviveram até o tempo t /número total de indivíduos

Esta função implica na ausência de censuras, presença de informações incompletas ou parciais.³⁵ É uma função semelhante a uma escada com degraus nos momentos em que o indivíduo morreu. Os degraus têm tamanho $1/n$ (n = tamanho da amostra) que é multiplicado pelo número de empates no caso deles ocorrerem.

A hipótese de nenhuma diferença entre as funções de sobrevivência e tratamentos foi testada usando o log-rank ou teste de Mantel Haenszel. Os valores- P

foram ajustados usando o método de Benjamin e Hochberg ³⁶ que controla a taxa de descoberta falsa (a proporção esperada de descobertas falsas entre as hipóteses rejeitadas), que é um dos métodos de ajuste do valor- *P* mais poderosos.

A análise estatística e os gráficos foram realizados usando os pacotes ggplot2, survival, survminer, aod, arm e emmeans de R v.4.0.0. ³⁷

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Experimento 1

Toque (contato entre operária com inseticida e as demais; <https://youtu.be/cEzq1bqbbAs>), autolimpeza (autolimpeza da operária contaminada; <https://youtu.be/2TZt9k3j14M>), limpeza mutua (limpeza mútua da operária com o inseticida pelas demais operárias; <https://youtu.be/29F0Slv1XNA>), toque 2 (contato entre operárias sem inseticida; <https://youtu.be/U4QZtC8zFok>), autolimpeza 2 (autolimpeza de operárias sem inseticida; <https://youtu.be/YqCXZ8CZP5s>) e limpeza mútua 2 (limpeza mútua entre operárias sem inseticida; https://youtu.be/d-kGLk24_oU) foram os atos comportamentais observados (Figura 1 e Tabela 1).

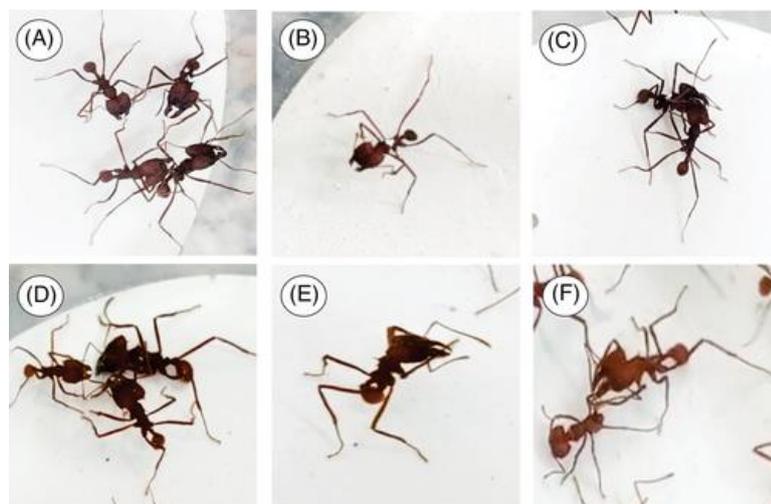


FIGURA 1. Atos comportamentais realizados por operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae): (A) toque; (B) autolimpeza; (C) limpeza mútua; (D) toque 2; (E) autolimpeza 2; e (F) limpeza mutua 2.

TABELA 1. Frequências comportamentais (média \pm erro padrão) de grupos dentro das categorias comportamentais encontradas em operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)

Sulfloramida			
Grupo	Autolimpeza	Autolimpeza 2	Toque
1: 1	12,33 \pm 1,63 a	7,33 \pm 0,88 a	8,33 \pm 1,64 a
4: 1	88,00 \pm 6,83 b	280,33 \pm 13,65 b	168,67 \pm 7,24 b
9: 1	85,00 \pm 7,05 b	448,33 \pm 17,21 b	245,00 \pm 6,25 b
19: 1	87,33 \pm 8,56 b	797,33 \pm 20,25 c	444,67 \pm 12,08 c
	Toque 2	Limpeza mútua	Limpeza mútua 2
1: 1	0,00 \pm 0,00a	8,67 \pm 2,61a	0,00 \pm 0,00a
4: 1	278,33 \pm 16,03b	77,67 \pm 2,33b	56,33 \pm 1,21b
9: 1	720,67 \pm 35,21c	59,00 \pm 1,51b	81,00 \pm 6,55b
19: 1	2728,00 \pm 125,23d	58,00 \pm 3,24b	147,67 \pm 7,85c
Fipronil			
	Autolimpeza	Autolimpeza 2	Toque
1: 1	13,00 \pm 1,73 a	18,33 \pm 1,21 a	18,67 \pm 1,21 a
4: 1	47,00 \pm 4,72 b	151,33 \pm 13,87 b	89,67 \pm 7,21 b
9: 1	45,00 \pm 0,00 b	266,67 \pm 22,11 c	145,00 \pm 12,09 c
19: 1	65,00 \pm 6,08 b	660,67 \pm 32,12 b	372,67 \pm 20,31 d
	Toque 2	Limpeza mútua	Limpeza mútua 2
1: 1	0,00 \pm 0,00 a	5,67 \pm 1,66 a	2,67 \pm 0,87 a
4: 1	152,33 \pm 15,34 b	41,33 \pm 4,48 b	28,67 \pm 3,17 b
9: 1	434,67 \pm 37,61 c	34,33 \pm 2,91 b	47,67 \pm 4,09 c
19: 1	2.322,00 \pm 139,91 d	46,00 \pm 2,08 b	131,00 \pm 10,58 d

As médias dentro de uma coluna que são seguidas pela mesma letra não diferem ($P = 0,05$).

Cada comportamento do grupo 19: 1 contaminado com os inseticidas fipronil e sulfloramida diferiu dos comportamentos dos grupos 9: 1, 4: 1 e 1: 1 (Tabela 1). Os comportamentos 'Toque 2' e 'Autolimpeza 2' foram mais frequentes e diferiram entre os grupos 19: 1, 9: 1 e 4: 1 (Tabela 2); a exceção foi o grupo 1: 1 contaminado com sulfloramida e fipronil. Os comportamentos do grupo 1: 1 sulfloramida não diferiram entre si (Tabela 2).

TABELA 2. Frequência de atos comportamentais (média \pm erro padrão) dentro dos grupos de operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)

Sulfluramida				
Comportamento	1: 1	4: 1	9: 1	19: 1
Autolimpeza	12,33 \pm 1,63 a	88,00 \pm 6,83 b	85,00 \pm 7,05 b	87,33 \pm 8,56 b
Autolimpeza 2	7,33 \pm 0,88 a	280,33 \pm 13,65 b	448,33 \pm 17,21 d	797,33 \pm 20,25 e
Toque	8,33 \pm 1,64 a	168,67 \pm 7,24 c	245,00 \pm 6,25 c	444,67 \pm 12,08 d
Toque 2	0,00 \pm 0,00 a	278,33 \pm 16,03 d	720,67 \pm 35,21 e	2,728,00 \pm 125,23 f
Limpeza mútua	8,67 \pm 2,61 a	77,67 \pm 2,33 b	59,00 \pm 1,51 a	58,00 \pm 3,24 a
Limpeza mútua 2	0,00 \pm 0,00 a	56,33 \pm 1,21 a	81,00 \pm 6,55 b	147,67 \pm 7,85 c
Fipronil				
Comportamento	1: 1	4: 1	9: 1	19: 1
Autolimpeza	13,00 \pm 1,73 d	47,00 \pm 4,72 a	45,00 \pm 5,85 a	65,00 \pm 6,08 a
Autolimpeza 2	18,33 \pm 1,21 d	151,33 \pm 13,87 c	266,67 \pm 22,11 c	660,67 \pm 32,12 d
Toque	18,67 \pm 1,21 d	89,67 \pm 7,21 b	145,00 \pm 12,09 b	372,67 \pm 20,31 c
Toque 2	0,00 \pm 0,00 a	152,33 \pm 15,34 c	434,67 \pm 37,61 c	2,322,00 \pm 139,91 e
Limpeza mútua	5,67 \pm 1,66 c	41,33 \pm 4,48 a	34,33 \pm 2,91 a	46,00 \pm 2,08 a
Limpeza mútua 2	2,67 \pm 0,87 b	28,67 \pm 3,17 a	47,67 \pm 4,09 a	131,00 \pm 10,58 b

As médias dentro de uma coluna que são seguidas pela mesma letra não diferem ($P = 0,05$).

1.3.2 Experimento 2

O valor residual do desvio de 74,083 em 42 df não é significativo ($P = 0,41$) e indica uma ausência de evidência contra o GLM Bayesiano com variância binomial e função de ligação logit. O efeito de ambos os inseticidas sobre a mortalidade das formigas não variou com a dose. O efeito da concentração de fipronil na mortalidade é quase o dobro da concentração de sulfluramida (Tabela 3).

TABELA 3. Modelo de regressão logística da frequência de operárias vivas e mortas de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) com diferentes formulações de inseticidas e o grupo de indivíduos

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	z value	Pr (> z)
(Intercept)	-4,4150	1,4486	-3,048	0,0023*
Fipronil 0,1%	14,0017	2,8414	4,928	8,32 e ^{-7*}
Fipronil 1,0%	14,0017	2,8414	4,928	8,32 e ^{-7*}
Sulfluramida 0,1%	7,2315	1,3261	5,453	4,94 e ^{-8*}
Sulfluramida 1,0%	8,0662	1,3335	6,049	1,46 e ^{-9*}
4: 1	0,8167	1,1603	0,704	0,4815
9: 1	-2,5081	0,9585	-2,617	0,0089*
19: 1	-2,9840	0,9475	-3,149	0,0016*

* Efeito significativo ($\alpha = 0,05$).

A mortalidade média em diferentes concentrações de inseticida variou apenas entre o inseticida e o controle e entre as duas concentrações de sulfluramida (Tabela 4).

TABELA 4. Comparação múltipla entre mortalidade média marginal (média \pm erro padrão) (Mortalidade) e os limites inferior (LIA) e superior (LSA) assintóticos para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em função de diferentes inseticidas

Inseticidas	Mortalidade	GL	LIA	LSA
Controle	0,003744 \pm 0,0044689	Inf	0,0003589	0,03785 a
Sulfluramida 0,1%	0,838566 \pm 0,0543862	Inf	0,7026987	0,91946 b
Sulfluramida 1,0%	0,922889 \pm 0,0298652	Inf	0,8402033	0,96459 bc
Fipronil 0,1%	0,999779 \pm 0,0005691	Inf	0,9666153	1,00000 bc
Fipronil 1,0%	0,999779 \pm 0,0005691	Inf	0,9666153	1,00000 bc

GL, grau de liberdade; Inf, informe. Os valores dentro de uma coluna que são seguidos pela mesma letra não diferem ($P = 0,05$).

A comparação múltipla entre a mortalidade proporcional média mostra que os grupos 1: 4 e 1: 1 diferem dos grupos 1:19 e 1: 9 (Tabela 5). As curvas de sobrevivência para o grupo 1: 1 contaminado com fipronil a 1,0% e 0,1% e os grupos 1: 1 e 1: 4 contaminado com sulfluramida 1,0% e 0,1% não diferiram entre si (Tabela 6 e Figura 2). No entanto, as curvas de sobrevivência diferiram entre os inseticidas nos grupos 1: 9 e 1:19.

TABELA 5. Comparação múltipla entre as estimativas de mortalidade média marginal (média \pm erro padrão) (Mortalidade) e os limites inferior (LIA) e superior (LSA) assintóticos para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em função de diferentes grupos de operárias

Grupo	Mortalidade	GL	LIA	LSA
19: 1	0,779 \pm 0,13561	Inf	0,430	0,943 a
9: 1	0,850 \pm 0,10309	Inf	0,537	0,965 a
1: 1	0,986 \pm 0,01625	Inf	0,876	0,999 b
4: 1	0,994 \pm 0,00699	Inf	0,946	0,999 b

GL, grau de liberdade; Inf, informe. Os valores dentro de uma coluna que são seguidos pela mesma letra não diferem ($P = 0,05$).

TABELA 6. Valor *P* das comparações múltiplas das curvas de sobrevivência para grupos de operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) contaminados com os inseticidas fipronil (Fip.) e sulfluramida (Sulf.)

Grupo	Tratamento	Fip. 0,1%	Fip. 1,0%	Sulf. 0,1%	Sulf. 1,0%
1: 1	Fipronil 1,0%	1,0000	-	-	-
	Sulfluramida 0,1%	0,0046	0,0046	-	-
	Sulfluramida 1,0%	0,0046	0,0046	0,2178	-
	Controle	0,0016	0,0016	0,0004	0,0004
4: 1	Fipronil 1,0%	0,002	-	-	-
	Sulfluramida 0,1%	4,6 e ⁻⁹	4,7 e ⁻⁹	-	-
	Sulfluramida 1,0%	2,9 e ⁻⁸	2,3 e ⁻⁸	0,771	-
	Controle	5,6 e ⁻¹⁰	1,1 e ⁻⁹	3,4 e ⁻¹⁰	3,4 e ⁻¹⁰
9: 1	Fipronil 1,0%	0,0002	-	-	-
	Sulfluramida 0,1%	2,0 e ⁻¹⁶	2,0 e ⁻¹⁶	-	-
	Sulfluramida 1,0%	2,0 e ⁻¹⁶	2,0 e ⁻¹⁶	0,0126	-
	Controle	2,0 e ⁻¹⁶	2,0 e ⁻¹⁶	1,1 e ⁻⁷	1,4 e ⁻¹³
19: 1	Fipronil 1,0%	5,1 e ⁻⁶	-	-	-
	Sulfluramida 0,1%	2,0 e ⁻¹⁶	2,0 e ⁻¹⁶	-	-
	Sulfluramida 1,0%	2,0 e ⁻¹⁶	2,0 e ⁻¹⁶	0,0001	-
	Controle	2,0 e ⁻¹⁶	2,0 e ⁻¹⁶	2,0 e ⁻¹⁶	2,0 e ⁻¹⁶

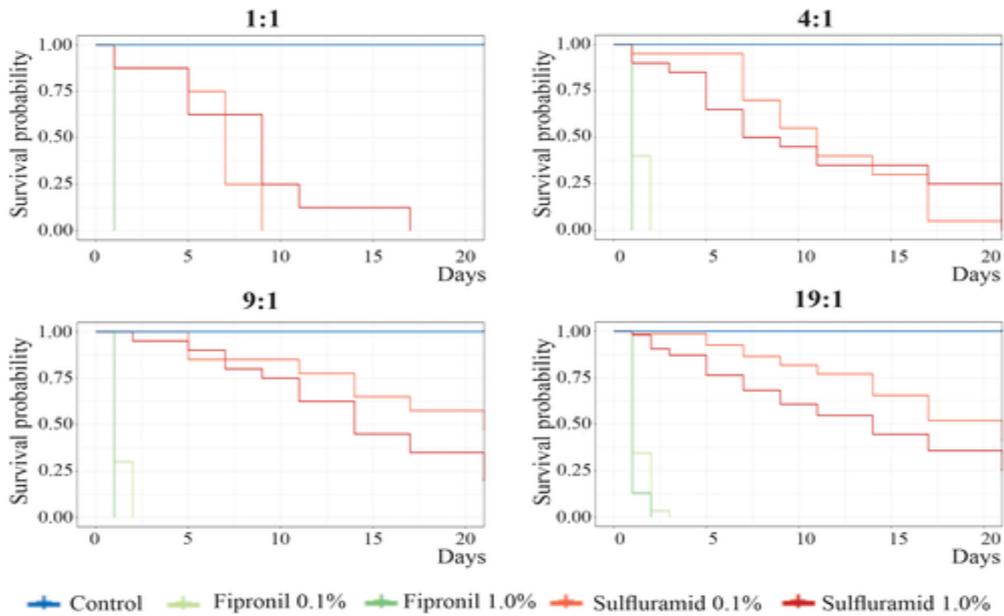


FIGURA 2. Curvas de sobrevivência dos grupos de operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) no controle e com os inseticidas fipronil e sulfluramida a 0,1% e 1,0%.

1.4 DISCUSSÃO

O toque entre as operárias e os comportamentos de autolimpeza e limpeza mútua confirmam a hipótese de que as interações sociais entre as operárias dispersam os inseticidas e contamina os demais companheiros de colônia. O maior número de interações observadas no grupo 19: 1 em relação aos demais grupos deve-se ao maior número de operárias neste grupo. Resultados semelhantes foram obtidos por Camargo et al.,⁷ onde o número de interações entre operárias no grupo 19: 1 foi maior do que nos demais grupos.

O comportamento de toque mais frequente entre as operárias, seguido de limpeza mútua e autolimpeza, pode dispersar os inseticidas.³⁸ No nosso caso, a dispersão ocorre quando operárias tratadas com inseticida no ponto de aplicação o transferem para outros membros da população,³⁸ por contato tarsal ou antenal como conforme as operárias se encontram em um grupo.³⁹ Esse tipo de dispersão de inseticida tem sido relatado para insetos sociais e semi-sociais, como a formiga argentina *Linepithema humile* (Mayr) (Hymenoptera: Formicidae), a formiga carpinteira *Camponotus pennsylvanicus* e a barata alemã *Blattella germanica* (L.),

que transferiram os inseticidas fipronil e indoxacarb para seus companheiros de colônia. ^{38 - 42}

Os notáveis comportamentos de higiene, limpeza mútua e autolimpeza, entre companheiras de colônia observados em muitas espécies de insetos ¹⁹ removem organismos patogênicos da superfície de seus corpos. ¹⁹ Por exemplo, limpeza mútua e autolimpeza removem eficientemente o fungo patogênico *Metarhizium* da cutícula do inseto. ^{43 - 45} No entanto, esses comportamentos de higiene não são eficientes no controle da dispersão de compostos químicos (inseticidas), ao contrário, dispersam inseticida entre as companheiras de colônia. ^{7, 26, 46} Isso ocorre porque os princípios ativos utilizados no controle dos FCs atuam por ingestão e contato e, conseqüentemente, os comportamentos de higiene proporcionam maior contato direto com o inseticida e, conseqüentemente, maior contaminação. ³ Além disso, as formigas limpam a si mesmas e umas às outras usando suas peças bucais e pernas anteriores, coletando partículas e substâncias inseticidas durante a autolimpeza e a limpeza mútua. Durante esses comportamentos, os inseticidas são ingeridos e absorvidos pela glândula pós-faríngea, conseqüentemente intoxicando as operárias e suas companheiras de colônia. ^{3, 7, 47, 48}

A dispersão de inseticidas provavelmente ocorreu devido ao toque excessivo entre as operárias, juntamente com posterior limpeza mútua e autolimpeza. A dispersão de inseticidas por meio de interações sociais como limpeza mútua e autolimpeza e o contato entre indivíduos contaminados e não contaminados ainda não tinha sido estudada e comprovada para FCs. Com isso fornecemos aqui resultados que demonstram que as interações sociais proporcionam a dispersão de substâncias inseticidas em FCs.

A mortalidade de formigas de 100% observada com o inseticida fipronil em todas as concentrações para todos os grupos em 2 dias confirma a atividade deste inseticida por contato e ingestão. ⁴⁹ Essa atividade desencadeia a maior taxa de contaminação entre as operárias com dispersão mais rápida do inseticida pelas interações sociais.

Sintomas rápidos com efeito knockdown pelo fipronil causam hiperatividade, incapacidade de se mover e subsequente morte em um curto período em insetos intoxicados. O fipronil pertence ao grupo químico fenilpirazol e atua no sistema nervoso central bloqueando a transmissão de sinais das células nervosas inibindo o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico. ^{49, 50}

A mortalidade mais lenta observada nos grupos de formigas tratados com sulfluramida (0,1% e 1,0%) e o aumento do número de indivíduos por grupo com 100% de mortalidade ao final de 21 dias nos grupos 1:1 e 1:4 em ambas as concentrações são devido a um mecanismo de ação retardado neste inseticida e ao fato de a sulfluramida atuar apenas por ingestão.^{30, 51} Dentro do corpo da operária, a sulfluramida se decompõe no composto principal DESFA (perfluorooctanossulfonamida), que atua na fosforilação oxidativa (respiração aeróbica), interrompendo gradativamente a produção de ATP nas mitocôndrias;⁵² isso é diferente do fipronil que atua no sistema nervoso. A sulfluramida e o DESFA atuam nas mitocôndrias, aumentando o quarto estágio respiratório no succinato.⁵² Movimentos lentos e uma grande diminuição da agressividade devido à redução de energia são os principais sintomas de intoxicação por sulfluramida em operárias de FC. A energia tende a diminuir até que o metabolismo seja interrompido, causando a morte das operárias.³

As interações sociais aumentaram a dispersão de inseticidas entre as operárias da FC *A. sexdens*. No entanto, o modo de ação e o contato ou ingestão influenciam na taxa de dispersão dos inseticidas estudados. Assim, a hipótese de que o contato indireto aumenta a contaminação das companheiras de ninho servindo de modelo para novos estudos sobre a contaminação de operárias com os princípios ativos de inseticidas.

1.5 CONCLUSÃO

As interações sociais, autolimpeza e limpeza mútua, além do contato entre as operárias, aumentaram a contaminação e mortalidade das LCAs pelos inseticidas fipronil e sulfluramida.

AGRADECIMENTOS

Tarcísio M. M. Mota Filho e Luís E. P. Stefanelli agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001 pelo apoio. Luiz C. Forti agradece o apoio do Conselho Nacional de Ciência, Pesquisa e Tecnologia (CNPq-PQ) (Número da Doação: 301938/2017-2).

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Tarcísio M. M. Mota Filho, José C. Zanuncio, Luís E. P. Stefanelli, Roberto da Silva Camargo, Luiz C. Forti e Carlos A. O. de Matos escreveu o jornal; Roberto da Silva Camargo e Luiz C. Forti conceberam e projetaram os experimentos; Luís E. P. Stefanelli e Tarcísio M. M. Mota Filho realizaram os experimentos; Luiz C. Forti contribuiu com reagentes/materiais/ferramentas de análise. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- 1 Gandra LC, Amaral KD, Couceiro JC, Della Lucia TM and Guedes RN, Mechanism of leaf-cutting ant colony suppression by fipronil used in attractive toxic baits. *Pest Manage Sci* **72**:1475–1481 (2016). <https://doi.org/10.1002/ps.4239>.
- 2 Mueller UG, Kardish MR, Ishak HD, Wright AM, Solomon SE, Bruschi SM et al., Phylogenetic patterns of ant–fungus associations indicate that farming strategies, not only a superior fungal cultivar, explain the ecological success of leaf cutter ants. *Mol Ecol* **27**:2414–2434 (2018). <https://doi.org/10.1111/mec.14588>.
- 3 Britto JS, Forti LC, Oliveira MA, Zanetti R, Wilcken CF, Zanuncio JC et al., Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Int J Res Env Std* **3**:11–92 (2016).
- 4 Della Lucia TM, Gandra LC and Guedes RN, Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Manage Sci* **70**:14–23 (2014). <https://doi.org/10.1002/ps.3660>.
- 5 Vinha GL, Alcántara-de la Cruz R, TMC DL, Wilcken CF, Silva ED, Lemes PG et al., Leaf-cutting ants in commercial forest plantations of Brazil: biological aspects and control methods. *South For J For Sci* **82**:95–103 (2020). <https://doi.org/10.2989/20702620.2019.1639596>.
- 6 Zanetti R, Zanuncio JC, Santos JC, Silva WLP, Ribeiro GT and Lemes PG, An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera:

- Formicidae) in Brazilian forest plantations. *Forests* **5**:439–454 (2014). <https://doi.org/10.3390/f503043>.
- 7 Camargo RS, Puccini C, Forti LC and Matos CAO, Allogrooming, selfgrooming, and touching behavior: contamination routes of leaf-cutting ant workers using a fat-soluble tracer dye. *Insects* **8**:59 (2017). <https://doi.org/10.3390/insects8020059>.
- 8 Forti LC, Camargo RS, Andrade APP, Catalani GC, Sousa KKA, Silva AAC et al., Contamination route of leaf-cutting worker ants analyzed through a fat-soluble tracer dye in toxic bait. *Neotrop Entomol* **48**:349–355 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13744-018-0652-1>.
- 9 Moreira DDO, Erthal M, Carrera MP, Silva CP and Samuels RI, Oral trophallaxis in adult leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera, Formicidae). *Insect Soc* **53**:345–348 (2006). <https://doi.org/10.1007/s00040-006-0879-4>.
- 10 Moreira DDO, Bailez AV, Erthal JM, Bailez O, Carrera MP and Samuels RI, Resource allocation among worker castes of the leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* through trophallaxis. *J Insect Physiol* **56**:1665–1670 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.06.018>
- 11 Wang L, Zhao F, Tao Q, Li J, Xu Y, Li Z et al., Toxicity and sublethal effect of triflumezopyrim against red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae). *J Econ Entomol* **113**:1753–1760 (2020). <https://doi.org/10.1093/jee/toaa083>.
- 12 Wiltz BA, Suiter DR and Gardner WA, Activity of bifenthrin, chlorfenapyr, fipronil, and thiamethoxam against red imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *J Econ Entomol* **103**:754–761 (2010). <https://doi.org/10.1603/EC09350>.
- 13 Hayashi M, Hojo MK, Nomura M and Tsuji K, Social transmission of information about a mutualist via trophallaxis in ant colonies. *Proc R Soc B* **284**:20171367 (2017). <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1367>.
- 14 Hölldobler B and Wilson EO, *The Ants*. Harvard University Press, Cambridge, MA, p. 733 (1990).
- 15 Silva AC, Navas CA and Ribeiro PL, Trophallaxis in dehydrated leaf cutting colonies of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* **54**:109

(2009).

- 16 Naug D and Camazine S, The role of colony organization on pathogen transmission in social insects. *J Theor Biol* **215**:427–439 (2002). <https://doi.org/10.1006/jtbi.2001.2524>.
- 17 Samuels RI, Erthal M and Moreira DDO Ocorrência de trofalaxia oral entre operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). XX Congresso Brasileiro de Entomologia, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil (2004).
- 18 Valles SM and Woodson WD, Group effects on insecticide toxicity in workers of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Pest Manage Sci* **58**:769–774 (2002). <https://doi.org/10.1002/ps.528>.
- 19 Wilson EO, The Insect Societies. Belknap Press, Cambridge, MA, p. 548 (1971).
- 20 Paul J and Roces F, Fluid intake rates in ants correlate with their feeding habits. *J Insect Physiol* **49**:347–357 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00019-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00019-2).
- 21 Garrett RW, Carlson KA, Goggans MS, Nesson MH, Shepard CA and Schofield RM, Leaf processing behaviour in *Atta* leafcutter ants: 90% of leaf cutting takes place inside the nest, and ants select pieces that require less cutting. *R Soc Open Sci* **3**:150111 (2015). <https://doi.org/10.1098/rsos.150111>.
- 22 Littleddyke M and Cherrett JM, Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). *Bull Entomol Res* **66**:205–217 (1976). <https://doi.org/10.1017/S0007485300006647>.
- 23 Caetano FH, Morphology of the digestive tract and associated excretory organs of ants, in Applied Myrmecology: A World Perspective, ed. by Vander Meer RK and Jaffé K. Westview Press, Boulder, CO, pp. 119–132 (1990).
- 24 Andrade APP, Forti LC, Moreira AA, Boaretto MAC, Ramos VM and Matos CAO, Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. *Sociobiology* **40**:293–306 (2002).
- 25 Catalani GC, Sousa KKA, Camargo RS, Caldato N, Matos CAO and Forti LC,

Chemical control of leaf-cutting ants: how do workers disperse toxic bait fragments onto fungus garden? *Rev Bras Entomol* **63**:290–295 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2019.09.004>.

26 Catalani GC, Camargo RS, Sousa KKA, Caldato N, Silva AAC and Forti LC, Fat-soluble substance flow during symbiotic fungus cultivation by leaf-cutter ants. *Neotrop Entomol* **49**:116–123 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13744-019-00718-0>.

27 Forti LC, Andrade APP, Sousa KKA, Camargo RS, Matos CAO, Caldato N et al., Do workers from subspecies *Acromyrmex subterraneus* prepare leaves and toxic baits in similar ways for their fungus garden? *Neotrop Entomol* **49**:12–23 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13744-019-00708-2>.

28 Camargo RS, Forti LC, Lopes JFS, Andrade APP and Ottati ALT, Age polyethism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). *J Appl Entomol* **131**:139–145 (2007). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01129.x>.

29 Bass M and Cherrett JM, The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. *Ecol Entomol* **19**:215–220 (1994). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1994.tb00412.x>.

30 Nagamoto NS, Forti LC, Andrade APP, Boaretto MAC and Wilcken CF, Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* **44**:413–432 (2004).

31 Brasil Instrução normativa n. 42, de 05 de dezembro de 2011, Ministério da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF, pp.4–5, Seção 1 (2011). Available: http://sistemasweb.agricultura.gov.br/conjurnormas/index.php/INSTRUÇÃO_NORMATIVA_Nº_42,_DE_5_DE_DEZEMBRO_DE_2011 [06 January 2021].

32 Cordeiro GM and Demétrio CGB, Generalized Linear Models and Extensions. USP, Piracicaba (2008).

33 Abbott WS, A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* **18**:265–267 (1925).

34 Kaplan EL and Meier P, Nonparametric estimation from incomplete observations. *J*

- Am Stat Assoc* **53**:457–481 (1985).
- 35 Giolo SR and Colosimo E, Applied Survival Analysis. Edgard Blucher, São Paulo (2006).
- 36 Benjamini Y and Hochberg Y, Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* **57**:289–300 (1995).
- 37 R Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2020). Available: <https://www.R-project.org/>. [06 December 2020].
- 38 Buczkowski G and Wessler TC, Controlling invasive Argentine ants, *Linepithema humile*, in conservation areas using horizontal insecticide transfer. *Sci Rep* **9**:1–7 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56189-1>.
- 39 Soeprono AM and Rust MK, Effect of horizontal transfer of barrier insecticides to control Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *J Econ Entomol* **97**:1675–1681 (2004). <https://doi.org/10.1603/0022-0493-97.5.1675>.
- 40 Choe DH and Rust MK, Horizontal transfer of insecticides in laboratory colonies of the Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae). *J Econ Entomol* **101**:1397–1405 (2008). <https://doi.org/10.1093/jee/101.4.1397>.
- 41 Buczkowski G, Trap–treat–release: horizontal transfer of fipronil in field colonies of black carpenter ants, *Camponotus pennsylvanicus*. *Pest Manage Sci* **75**:2195–2201 (2019). <https://doi.org/10.1002/ps.5345>.
- 42 Buczkowski G, Scherer CW and Bennett GW, Horizontal transfer of bait in the German cockroach: indoxacarb causes secondary and tertiary mortality. *J Econ Entomol* **101**:894–901 (2008). <https://doi.org/10.1093/jee/101.3.894>.
- 43 Hughes WOH, Eilenberg J and Boomsma JJ, Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proc R Soc B* **269**:1811–1819 (2002). <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2113>.
- 44 Rosengaus RB, Maxmen AB, Coates LE and Traniello JF, Disease resistance: a benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae). *Behav Ecol Sociobiol* **44**:125–134 (1998). <https://doi.org/10.1007/s002650050523>.

- 45 Yanagawa A, Yokohari F and Shimizu S, Defense mechanism of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki, to entomopathogenic fungi. *J Invertebr Pathol* **97**:165–170 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.09.005>.
- 46 Bueno OC, Fresneau D, Schineider OM, Silveira C, Bueno FC (2001) Fluxo de corantes hidrossolúveis e lipossolúveis no trato digestivo de operárias de *Atta sexdens* L. 1758 (Hymenoptera: Formicidae). Anais do XV Encontro de Mirmecologia, Londrina, PR, Brasil.
- 47 Forti LC, Martins FSD, Yassu WK and Pinhão MAS, Trofalaxia entre operárias-larvas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae), in Anais do 14° Congresso Brasileiro de Entomologia, Piracicaba, SP. SEB - Piracicaba, Piracicaba, SP (1993).
- 48 Vander Meer RK, Lofgren CS and Williams DF, Fluoroaliphatic sulfones: a new class of delayed-action insecticides for control of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *J Econ Entomol* **78**:1190–1197 (1985). <https://doi.org/10.1093/jee/78.6.1190>.
- 49 Tomlin CDS, The Pesticide Manual, 12th edn. Aldershot, British Crop Protection Council (2000).
- 50 Cole LM, Nicholson RA and Casida JE, Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic Biochem Physiol* **46**:47–54 (1993). <https://doi.org/10.1006/pest.1993.1035>.
- 51 Nagamoto NS, Forti LC and Raetano CG, Evaluation of the adequacy of diflubenzuron and dechlorane in toxic baits for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) based on formicidal activity. *J Pest Sci* **80**:9–13 (2007). <https://doi.org/10.1007/s10340-006-0143-8>.
- 52 Schnellmann RG and Manning RO, Perfluorooctane sulfonamide: a structurally novel uncoupler of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1016**:344–348 (1990). [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90167-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90167-3).

CAPÍTULO 2

Comportamento de Limpeza Mútua, Autolimpeza e Toque Como um Mecanismo Para Dispersar Inseticidas Dentro das Colônias de Uma Formiga Cortadeira ²

Tarcísio Marcos Macedo Mota Filho ^{*},¹ · Roberto da Silva Camargo ¹ · Luis Eduardo Pontes Stefanelli ¹ · José Cola Zanuncio ² · Alexandre dos Santos ³ · Carlos Alberto Oliveira de Matos ⁴ · Luiz Carlos Forti ¹

1 Depto de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Univ Estadual Paulista - FCA/UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

2 Depto de Entomologia/BIOAGRO, Univ Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

3 Lab de Fitossanidade (FitLab), Instituto Federal de Mato Grosso - IFMT, Cáceres, Mato Grosso, Brasil

4 Campus Experimental de Itapeva, Univ Estadual Paulista - UNESP, Itapeva, São Paulo, Brasil

* Tarcísio Marcos Macedo Mota Filho: tarcisio972010@hotmail.com

Mota Filho, T. M. M., Camargo, R. S., Stefanelli, L. E. P., Zanuncio, J. C., Santos, A., Matos, C. A. O., Forti, L. C. Allogrooming, Self-grooming, and Touching Behavior as a Mechanism to Disperse Insecticides Inside Colonies of a Leaf-Cutting Ant. **Neotropical Entomology**, p. 1- 8, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13744-021-00927-6>

Resumo

Isclas tóxicas, contendo os princípios ativos sulfluramida ou fipronil, são os principais métodos de controle de formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* Fabricius, 1805, e *Acromyrmex* Mayr, 1865 (Hymenoptera: Formicidae). Porém, a dispersão do inseticida entre os membros da colônia durante o controle necessita de mais estudos. Avaliamos se os comportamentos de limpeza mútua, autolimpeza e toque entre os indivíduos disseminam os inseticidas entre os membros da colônia. Os inseticidas sulfluramida e fipronil (0,1% e 1,0% (p / p)) foram aplicados topicamente em grupos de operárias de

² Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico **Neotropical Entomology**, onde foi publicado

Atta sexdens (Linnaeus, 1758), e as interações sociais entre as operárias com ou sem inseticida foram estudadas. Além disso, iscas tóxicas (sulfluramida ou fipronil) foram fornecidas para as colônias e seus atos comportamentais foram observados. No final do experimento, a mortalidade das colônias, o número e a massa de operárias mortas e a massa de dejetos úmidos foram comparados entre colônias que receberam iscas tóxicas e as que receberam formigas com aplicação tópica. Na aplicação tópica, os comportamentos de toque e limpeza mútua foram os mais frequentes. A análise comportamental mostrou maior interação entre as formigas nas colônias que receberam as concentrações de sulfluramida. Nas iscas, o comportamento de lambe o pellet e a limpeza mútua foram os mais frequentes. A mortalidade das colônias foi mais rápida para aquelas que receberam aplicação tópica, principalmente com o inseticida fipronil (0,1%). Contudo, o número e a massa de operárias mortas foram semelhantes entre a aplicação tópica e iscas tóxicas. Nas iscas tóxicas, o comportamento de lambe os pellets e a subsequente limpeza mútua provavelmente dispersou os inseticidas. Na aplicação tópica, a rota do inseticida ocorreu por toques excessivos entre as operárias, com posterior limpeza mútua. Assim, a limpeza mútua, autolimpeza e o toque entre as operárias dispersou os inseticidas entre os membros das colônias.

Palavras-chave: *Atta* • Rotas de contaminação • Dispersão de Inseticidas • Interações sociais • Trofalaxia

2.1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* Fabricius, 1805 e *Acromyrmex* Mayr 1865 (Hymenoptera: Formicidae), ocorrem exclusivamente na região Neotropical e são apontadas como as principais pragas de plantios florestais, da agricultura e da pecuária (Vinha et al. 2020). O controle químico com iscas tóxicas, contendo os ingredientes ativos sulfluramida ou fipronil, é o principal método de controle desses insetos (Della Lucia et al. 2014; Zanetti et al. 2014).

A contaminação das operárias ocorre através do contato direto com o ingrediente ativo contido nas iscas tóxicas durante o cultivo do fungo simbiote (Britto et al. 2016; Camargo et al. 2017a). Durante esse processo, os inseticidas contaminam 50% das operárias (Forti et al. 2019), no entanto, não se sabe exatamente como as demais integrantes de uma colônia são contaminados com os inseticidas.

Alguns autores propõem que a dispersão de inseticidas em iscas para outros membros da colônia pode ocorrer por trofalaxia (Rust et al. 2004; Moreira et al. 2006, 2010; Buczkowski 2019). A trofalaxia é um comportamento associado à ingestão e troca de fluidos, armazenados durante o forrageamento das operárias e regurgitados entre os membros da colônia. Esse comportamento desempenha um papel importante na troca de nutrientes, simbiontes, feromônios e informações entre os indivíduos da colônia (Hölldobler e Wilson 1990; Moreira et al. 2015; Meurville e LeBoeuf 2021). Além disso, não há redução desse comportamento social mesmo que os indivíduos estejam contaminados com substâncias tóxicas (Souza et al. 2008).

No entanto, sabe-se que operárias de *Atta sexdens* (Myrmicinae) realizam esse comportamento com baixa frequência, quando comparadas com outras formigas que se alimentam de néctar como *Camponotus rufipes* (Formicidae) e *Neoponera villosa* (Ponerinae) (Paul e Roces 2003). Isso se deve pelo fato de que espécies que coletam fluidos (néctar) durante o forrageamento, possuem um papo bem desenvolvido, adaptado a esta estratégia de forrageamento (Eisner, 1957; Paul e Roces 2003). Embora as formigas cortadeiras ingiram líquidos durante a manipulação das folhas e durante a colheita de gongilídios no jardim de fungos, seu papo não é adaptado para armazenar grandes volumes de líquido (Caetano, 1990). Por exemplo: a taxa de ingestão de líquidos de operárias de *C. rufipes* é de 6,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, muito maior que a de *A. sexdens*, que não excede 0,6 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Paul e Roces 2003). Além disso a principal fonte de alimentação das formigas cortadeiras são hifas do fungo *Leucocoprinus*

gongylophorus (Heim, 1957) que cultivam nas câmaras de fungo do seu ninho (Schultz et al., 2005) e raramente alimentam-se de substâncias líquidas (Littlelyke e Cherrett 1976; Garrett et al. 2015).

Com isso, a trofalaxia não é a principal forma de dispersão e contaminação de operárias de formigas com inseticidas dentro da colônia. A intoxicação por contato direto com iscas tóxicas durante seu processamento e incorporação no jardim de fungos e os comportamentos higiênicos como autolimpeza e limpeza mutua, bem como o contato entre operárias contaminadas e não contaminadas são o mecanismo mais importante de dispersão de inseticidas para outros membros da colônia (Andrade et al. 2002; Camargo et al. 2017a; Forti et al. 2020). Por exemplo, as Interações sociais entre operárias de *A. sexdens*, como autolimpeza, limpeza mutua e o contato entre formigas contaminadas e não contaminadas, foram as principais vias de dispersão de uma substância lipossolúvel para aproximadamente metade das companheiras de colônia (Camargo et al. 2017a; Catalani et al. 2020). No entanto, a dispersão de inseticidas em iscas tóxicas por meio desses atos comportamentais não foi estudada.

Diante do exposto, surge o seguinte questionamento: como o inseticida é disperso em colônias de formigas cortadeiras? Nossa hipótese é que o contato entre operárias contaminadas com o inseticida durante a autolimpeza, limpeza mútua e toque proporciona dispersão do inseticida dentro da colônia e proporcionam a sua supressão. Para testar essa hipótese, operárias de *A. sexdens* foram contaminadas topicamente com duas concentrações dos inseticidas sulfluramida e fipronil (0,1% e 1% (p/p)), e em seguida, foram estudadas as interações sociais entre operárias com e sem inseticida. Além disso, iscas tóxicas a base de Sulfuramida (0.3%) ou Fipronil (0.01%), foram fornecidas em colônias de *A. sexdens* e as interações sociais também foram observadas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Colônias estudadas

As colônias de *A. sexdens* utilizadas tinham aproximadamente seis meses de idade com 350,0 cm³ de jardim de fungo e foram coletadas em março de 2020 em Botucatu, São Paulo, Brasil. Essas colônias foram mantidas no Laboratório de Insetos Sociais Praga (LISP) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

(UNESP), em Botucatu, a 24 ± 2 ° C, UR de 80% e fotoperíodo de 12 h de luz. Cada colônia foi mantida dentro de um recipiente plástico (comprimento: 15 cm, largura: 15 cm e altura: 15 cm) com um jardim de fungo, e receberam *Acalypha* spp. (folhas e caules).

2.2.2 Configuração experimental

A hipótese é que as interações sociais, limpeza mútua e autolimpeza, além de o toque entre as operárias, dispersam os inseticidas dentro das colônias da formiga cortadeira *A. sexdens* e levam à sua supressão. Operárias foram contaminados com duas concentrações (0,1% e 1,0% (p/p)) dos inseticidas fipronil e sulfluramida, além disso, iscas tóxicas comerciais contendo esses compostos foram fornecidas na câmara de forrageamento, e as interações sociais entre os indivíduos das colônias foram estudadas.

O número de indivíduos contaminados foi baseado na quantidade de ingrediente ativo contido em 0,3 g de isca tóxica (Material Complementar 1). Isso é equivalente a 3 e 30 operárias de tamanho médio (largura da cabeça de 1,2 a 2,2 mm) contaminadas topicamente com 1,0 µl de solução de fipronil dissolvido em óleo vegetal nas concentrações de 0,1% e 1% (p / p), respectivamente, ou 60 e 600 operárias contaminadas com 1,0 µl de solução de sulfluramida dissolvida em óleo vegetal nas concentrações de 0,1% e 1% (p/p), respectivamente. Os tratamentos controle consistiram no mesmo número de indivíduos expostos aos inseticidas fipronil e sulfluramida; no entanto, eles foram contaminados com apenas com 1 µl de óleo vegetal. Além disso, a isca composta por polpa cítrica (96%) e óleo de soja (4%) também foi usada como tratamento de controle (Forti et al. 2019, 2020).

As operárias de *A. sexdens* foram removidas de suas colônias e separadas por categoria de tamanho, com base na largura da cabeça. O pronoto das operárias foi marcado com um pequeno ponto de tinta confeccionado com caneta (Edding®) com excelente aderência, secagem rápida e boa visibilidade (Camargo et al. 2007). As operárias permaneceram por 2 horas em copos plásticos com as bordas untadas com Fluon (resina de fluoroetileno), produto que impede a fuga das formigas, e de acordo com os tratamentos, 1,0 µl de inseticida foi aplicado topicamente no pronoto das operárias com micro seringa Hamilton™ (5,0 µl), que foram então liberados em suas respectivas colônias.

2.2.3 Experimento

Os tratamentos foram iscas tóxicas - fipronil (0,01% p/p) e sulfuramida (0,2% p/p) - aplicação tópica de fipronil 1,0%, fipronil 0,1%, sulfuramida 1,0% e sulfuramida 0,1% e os controles.

Os resíduos e folhas restantes foram retirados das câmaras de resíduos e de forrageamento e as colônias ficaram sem receber o substrato vegetal por 24 horas. Após esse período, cada colônia recebeu 0,3 g de isca tóxica ou indivíduos contaminados na câmara de forrageamento. O recipiente do jardim de fungos foi fechado com uma tampa de vidro transparente; em seguida, foram observados os comportamentos das operárias dentro das colônias.

As observações duraram 6 h e foram realizadas em intervalos regulares de 30 min. Seguiu-se o protocolo de observação de varredura (Martin e Bateson 1986), onde as operárias são observadas, e o comportamento de cada formiga é registrado. Foi quantificada a frequência de atos comportamentais de cada operária. Os atos comportamentais observados para aplicação tópica foram (i) toque - toques entre a operária contaminada e as demais; (ii) autolimpeza - autolimpeza da operária contaminada; (iii) limpeza mútua - limpeza da operária contaminada pelas demais; (iv) toque 2 - toques entre operárias sem o inseticida; (v) autolimpeza 2 - auto limpeza das operárias sem inseticida; (vi) limpeza mútua 2 - limpeza entre as operárias sem inseticida (Material Complementar 2, 3). Os atos comportamentais observados para a aplicação da isca foram (i) transportar os pellets para o jardim de fungos; (ii) segurar o pellet; (iii) lambear o pellet; (iv) fragmentar o pellet; (v) incorporar o pellet; (vi) autolimpeza; e (vii) limpeza mútua (Material Complementar 4).

Vinte e quatro horas após o primeiro dia de avaliação, o substrato vegetal foi fornecido na câmara de forrageamento para manter o crescimento do fungo simbiótico. A mortalidade das formigas foi observada diariamente e, ao final do experimento (morte das colônias), avaliou-se o número de operárias mortas, a massa total de operárias mortas e a massa de dejetos úmidos da câmara de lixo.

2.2.4 Análise estatística

Os quatro tratamentos relacionados à aplicação tópica foram comparados com seus controles usando o teste de soma de postos de Wilcoxon com correção de

continuidade (teste U de Mann-Whitney). Posteriormente, esses mesmos dados relacionados à aplicação tópica foram submetidos ao teste de Kruskal - Wallis. Uma comparação múltipla foi realizada entre os diferentes tratamentos para os atos comportamentais mais frequentes realizados pelas operárias. O número de operárias mortas, a massa de operárias mortas e a massa dos resíduos úmidos foram realizados com o teste de soma de postos de Wilcoxon pareado com o ajuste do valor P através do método da taxa de falsa descoberta (Benjamini e Hochberg 1995) ($\alpha = 0,05$). Os dados dos tratamentos com isca foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e comparação múltipla de medianas com o teste de soma de postos de Wilcoxon aos pares com correção de continuidade.

A função de sobrevivência foi calculada usando o estimador Kaplan-Meier (também conhecido como o limite do produto) (Kaplan e Meier 1985), que é uma adaptação da função de sobrevivência empírica:

$S(t)$ - número de indivíduos que sobreviveram até o tempo t /número total de indivíduos.

Esta função implica na ausência de censura e na presença de informações incompletas ou parciais (Colosimo e Giolo 2006) como uma função em forma de escada com degraus no momento em que ocorreu a morte do indivíduo. O tamanho dos degraus ($n =$ tamanho da amostra) foi multiplicado pelo número de empates, caso ocorressem.

A hipótese de que não houve diferenças entre os tratamentos nas funções de sobrevivência foi testada com o log-rank ou os testes de Mantel-Haenszel. Os valores P foram ajustados (Benjamini e Hochberg 1995) para controlar a taxa de falsa descoberta (a proporção esperada de descobertas falsas entre as hipóteses rejeitadas) e que é um dos métodos mais poderosos para ajustar os valores P .

O pacote survival do ambiente R versão 4.0.0 foi usado para computação estatística e gráficos (R Core Team 2020).

2.3 RESULTADOS

O comportamento de toque, seguido de limpeza mútua e autolimpeza, foram os mais frequentes tanto com as concentrações dos inseticidas (fipronil e sulfluramida) quanto no controle (Fig. 1 e Material Complementar 5, 6). Comportamentos realizados por operárias de *A. sexdens* contaminadas com diferentes concentrações dos

inseticidas sulfluramida e fipronil não diferiram de seu respectivo controle (Fig. 1 e Material Complementar 5). Os comportamentos das operárias, em geral, diferiram entre as concentrações do inseticida, sendo mais frequente nas colônias que receberam a aplicação de 0,1% e 1,0% de sulfluramida (Fig. 1 e Material Complementar 6). Os comportamentos realizados durante a preparação dos pellets a serem incorporados ao jardim de fungos foram semelhantes entre as iscas tóxicas e o controle (Fig. 2 e Material Suplementar 7).

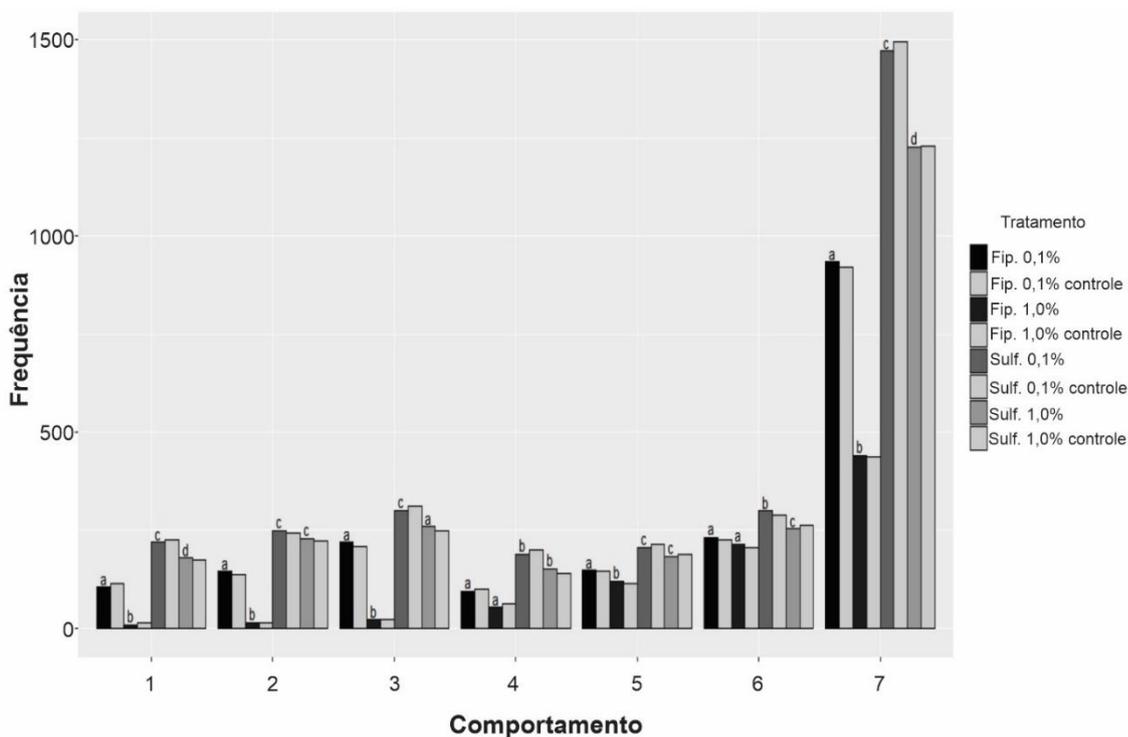


Fig. 1 Frequência de comportamentos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) com aplicação tópica de duas concentrações dos inseticidas fipronil (Fip.) E sulfluramida (Sulf.) e o respectivo controle. Não há diferenças entre as medianas dos tratamentos e seus respectivos controles. As medianas seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de soma de postos de Wilcoxon aos pares com o ajuste dos valores P ($\alpha = 0,05$). Comportamentos: (1) autolimpeza; (2) limpeza mútua; (3) toque; (4) autolimpeza 2; (5) limpeza mútua 2; (6) toque 2; e (7) total

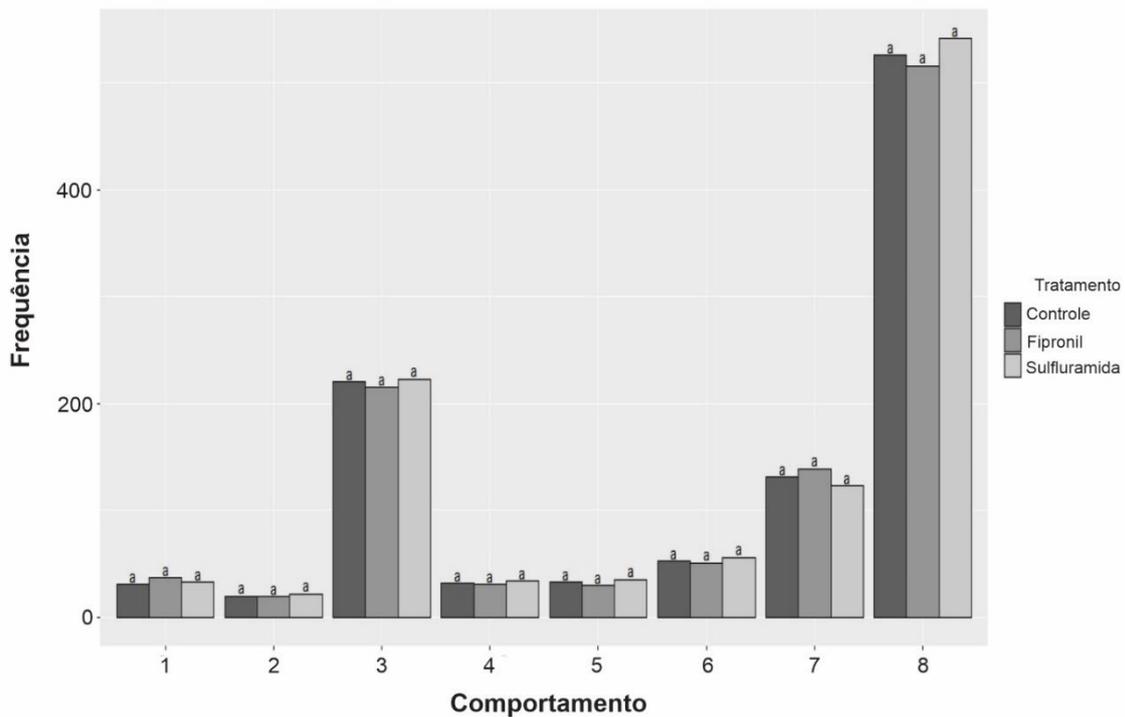


Fig. 2 Frequência de comportamentos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) durante o preparo de iscas tóxicas com os inseticidas fipronil e sulfluramida e o controle, para incorporação no jardim de fungo. As medianas seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de soma de postos de Wilcoxon aos pares com o ajuste dos valores P ($\alpha = 0,05$). Comportamentos: (1) transportar do pellet; (2) segurar o pellet; (3) lamber o pellet; (4) fragmentar o pellet; (5) incorporar do pellet; (6) autolimpeza; (7) limpeza mútua; e (8) total

A sobrevivência de colônias de *A. sexdens* nos tratamentos fipronil 0,1% ($p = 0,001$), fipronil 1,0% ($p = 0,001$), sulfluramida 0,1% ($p = 0,006$) e sulfluramida 1,0% ($p = 0,010$) e isca tóxica contendo fipronil ($p = 0,001$) ou sulfluramida ($p = 0,001$) foi inferior ao de seu respectivo controle. A sobrevivência (2 dias) das colônias que receberam operárias contaminadas com fipronil 0,1% foi menor do que aquelas que receberam operárias contaminadas com as demais concentrações e formulação dos inseticidas fipronil e sulfluramida (Fig. 3 e Material Complementar 8, 9). Por outro lado, o maior tempo de sobrevivência (7 dias) foi nas colônias que receberam iscas contendo o inseticida sulfluramida e diferiu de todos os outros tratamentos. As curvas de sobrevivência das colônias com as duas concentrações de sulfluramida (0,1% e 1,0%) não diferiram e aquelas com este inseticida também não diferiram da concentração de fipronil 1,0% (Fig. 3 e Material Suplementar 8, 9). A sobrevivência

(3 dias) das colônias que receberam isca contendo fipronil é estatisticamente idêntica àquelas que receberam operárias contaminadas topicamente com fipronil 1,0% (Fig. 3 e Material Complementar 8, 9).

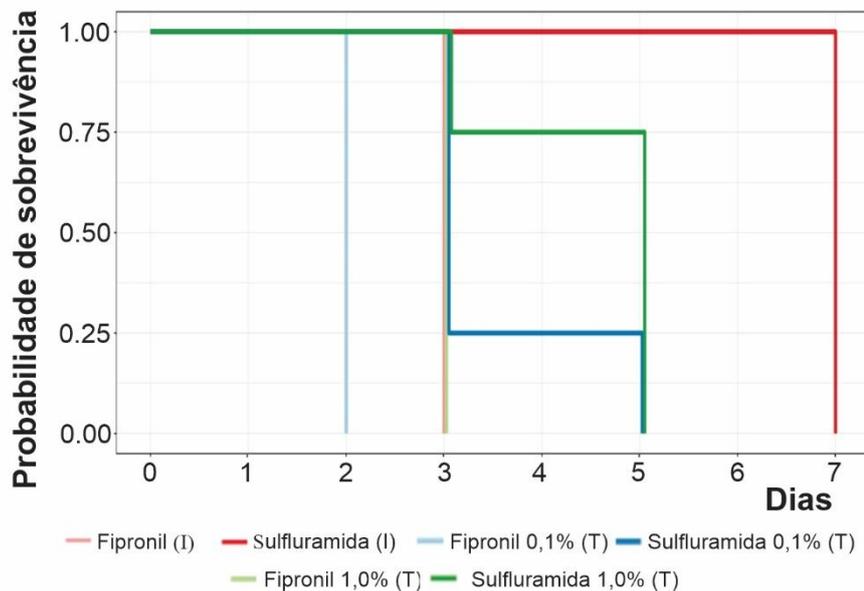


Fig. 3 Curvas de sobrevivência de colônias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em função de diferentes concentrações (aplicação tópica (T) e iscas tóxicas (I)) com inseticidas fipronil ou sulfluramida

O número e a massa de operárias mortas foram semelhantes entre as duas concentrações e formulações dos inseticidas fipronil e sulfluramida (Tabela 1). Além disso, as formigas não produziram resíduos úmidos (resíduos) nas colônias que receberam operárias contaminadas com as duas concentrações dos inseticidas (Tabela 1). A produção de resíduos úmidos foi maior na testemunha e semelhante nas colônias que receberam as iscas tóxicas. Nos cinco tratamentos controle, não houve indivíduos mortos e a produção de resíduos úmidos foi semelhante ($p = 0,3581$).

Tabela 1 Número de operárias mortas (número de mortas), massa de operárias mortas (massa de mortas) e massa de resíduos em colônias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) que receberam as duas concentrações (iscas tóxicas (I) e aplicação tópica (T)) com os inseticidas fipronil e sulfluramida. As medianas seguidas por letras diferentes por coluna diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$)

Tratamento	Número de mortas	Massa de mortas (g)	Massa de resíduos (g)
Fipronil (I)	885,5	3,618	1,611 a
Sulfluramida (I)	901,5	3,675	0,977 a
Fipronil 0,1% (T)	875,5	3,581	-
Fipronil 1,0% (T)	876,5	3,633	-
Sulfluramida 0,1% (T)	843,0	3,578	-
Sulfluramida 1,0% (T)	903,0	3,759	-
Controle	-	-	6,348 b
<i>p</i> -value	0,871	0,982	0,018

2.4 DISCUSSÃO

2.4.1 Aplicação tópica

As interações sociais, limpeza mútua, autolimpeza e toques entre as operárias dispersaram os inseticidas dentro das colônias da formiga cortadeira *A. sexdens*, levando à sua supressão. A maior interação social ocorreu nas colônias que receberam as concentrações de 0,1% e 1,0% de sulfluramida, devido ao aumento do número de operárias contaminadas, 60 e 600, respectivamente. As interações sociais de *A. sexdens* como mecanismo de dispersão de inseticidas, são semelhantes às relatadas para espécies de insetos com hábitos sociais, semi-sociais e até solitários (Rust e Saran 2006; Buczkowski et al. 2008; Akhtar e Isman 2013). Por exemplo, a formiga carpinteira preta, *Camponotus pennsylvanicus* DeGeer (Hymenoptera: Formicidae), através de interações sociais dispersou o inseticida fipronil para companheiros de colônia (Buczkowski 2019); a barata alemã *Blattella germanica*

Linnaeus, 1767 (Dictyoptera: Blattellidae), dispersou o inseticida indoxacarb para seus companheiros de colônia (Buczowski et al. 2008); e as larvas de *Heortia vitessoides* Moore (Lepidoptera: Crambidae) dispersaram o inseticida avermectina para companheiros de grupo (Liang et al. 2019). No entanto, a dispersão de inseticidas por meio de interações sociais por formigas cortadeiras necessita de mais estudos com apenas um abordando esse tipo de dispersão entre operárias de *A. sexdens*. Onde o comportamento de autolimpeza, limpeza mútua e toque entre operárias contaminadas e não contaminadas dispersaram uma substância lipossolúvel para aproximadamente metade de seus companheiros de colônia (Camargo et al. 2017a).

A dispersão de substâncias inseticidas dentro da colônia ocorre quando operárias adquirem o inseticida no ponto de aplicação e, posteriormente, o transferem para outros membros da população, através do contato tarsal ou antenal conforme as operárias se encontram em um grupo, ou pelo toque aleatório entre operárias (Soeprono e Rust, 2004; Buczowski e Wossler, 2019). E posteriormente, durante os comportamentos de autolimpeza e a limpeza mútua, as formigas se limpam e limpam umas às outras usando suas peças bucais, antenas e pernas, e as substâncias inseticidas coletadas durante os toques aleatórios, são ingeridas e absorvidas pela glândula pós-faríngea e conseqüentemente levando a intoxicação de toda a colônia (Vander Meer et al. 1985; Britto et al. 2016; Camargo et al., 2017a).

As interações sociais de formigas cortadeiras, incluindo estudos comportamentais em outros insetos sociais, normalmente se concentram no efeito positivo dos comportamentos de limpeza (limpeza mútua e autolimpeza) em indivíduos expostos a patógenos (Soroker et al. 1995; Hughes et al. 2002; Theis et al. 2015). A limpeza mútua e autolimpeza são eficazes na remoção de parasitas como *Metarhizium* da cutícula das formigas (Hughes et al. 2002) o que torna esses insetos praticamente imunes a este e outros microrganismos através da exposição e contato (Walker e Hughes 2009). No entanto, esses comportamentos higiênicos não são eficientes para controlar a dispersão de inseticidas e, ao contrário, aumentam sua dispersão entre os companheiros de colônia (Bueno et al. 2001; Theis et al. 2015; Camargo et al. 2017a). A dispersão dos inseticidas provavelmente ocorreu devido à alta frequência de toques entre as operárias seguidos dos comportamentos de limpeza mútua e autolimpeza.

2.4.2 Aplicação isca

O comportamento de lambar os pellets de ambas as iscas tóxicas corrobora resultados com atos comportamentais realizados por *Acromyrmex subterraneus* Forel, 1893, e *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, durante a incorporação de pellets de isca em seu jardim de fungo (Silva et al. 2015; Forti et al. 2019). O comportamento de lambar o pellet é frequente em formigas cortadeiras, devido as secreções produzidas em suas glândulas metapleurais e mandibulares possuírem propriedades antibióticas e antifúngicas que ao lambar a superfície de substratos para serem incorporados no jardim de fungo, promovem a assepsia do substrato, beneficiando assim o crescimento do fungo simbiote (Fernández-Marín et al. 2006; Britto et al. 2016; Garrett et al. 2016). Além disso, o comportamento de lambar hidrata os pellets, facilita seu processamento para posterior incorporação no jardim de fungo (Silva et al. 2015). No entanto, o comportamento de lambar o *pellet* é uma importante rota de contaminação das operárias de formigas cortadeiras, pois quando um substrato nocivo (inseticida) é fornecido este ato comportamental não muda, mas é potencializado para otimizar a assepsia do substrato (Sousa et al 2017), favorecendo a contaminação do fungo simbiótico (Silva et al 2015; Garrett et al 2015, Camargo et al 2017b).

Os comportamentos de transportar, fragmentar, incorporar e segurar o *pellet* foram os menos frequentes durante o preparo da isca. O comportamento de transporte do pellet demanda o maior gasto energético das formigas cortadeiras (Garrett et al. 2016) e é seu primeiro contato direto com o ingrediente ativo nas iscas tóxicas. Além disso, dependendo da distância do local de coleta do pellet ao ninho, esse comportamento é aquele com maior período de contato entre a formiga operária e o inseticida. O ato de segurar o pellet promove a sua estabilidade, diminuindo a movimentação e promovendo uma tensão para o corte ou outros comportamentos de processamento, podendo reduzir o gasto energético (Garrett et al. 2016). O comportamento de fragmentar o pellet reduz esse substrato em pequenas partes (Garrett et al. 2016), tornando mais fácil para as operárias menores realizarem outros comportamentos de processamento (Bos et al. 2011). Assim, existe a possibilidade de que esses comportamentos proporcionem contato direto entre as operárias e o inseticida nas iscas tóxicas.

A limpeza mútua e autolimpeza como segundo e terceiro comportamentos mais frequentes, respectivamente, indicam que o contato direto com iscas tóxicas não causa contaminação de todos os membros de uma colônia (Forti et al. 2019). A

limpeza mútua realizada pelas operárias e associado ao reconhecimento das companheiras de ninho é acionado quando uma substância é reconhecida no tegumento da companheira de ninho (Soroker et al. 1995; Hughes et al. 2002). Isso também ocorre com a autolimpeza, pois as formigas aumentam esse comportamento em resposta à exposição a substâncias nocivas (Bos et al. 2011; Theis et al. 2015; Camargo et al. 2017b).

A dispersão do inseticida entre as operárias provavelmente ocorreu devido à alta intensidade de limpeza mútua e autolimpeza como encontrado para *A. sexdens* e *A. sexdens rubropilosa* (Bueno et al. 2001; Barbieri et al. 2009; Camargo et al. 2017b; Forti et al. 2019). Assim, esses comportamentos estão relacionados à dispersão de inseticidas entre companheiros de colônia, quando aplicados em iscas tóxicas.

2.4.3 Comparação aplicação tópica vs. Isca

A mortalidade de 100% das colônias com iscas tóxicas e aplicação tópica e o menor período de sobrevivência (2 dias) com a concentração de 0,1% de fipronil foram provavelmente devidos a essa ação inseticida. O fipronil é do grupo químico fenilpirazol, atuando no sistema nervoso central, bloqueando a transmissão de sinais das células nervosas e inibindo o neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico), levando ao efeito knockdown (Tomlin 2000). Além disso, o fipronil é tóxico em baixas quantidades e facilmente transferível (Gandra et al. 2016; Buczkowski e Wossler 2019) por contato e ingestão entre formigas (Tomlin 2000). Provavelmente, as interações sociais aumentam a taxa de contaminação com a dispersão mais rápida do inseticida entre as formigas operárias.

A mortalidade tardia de colônias de *A. sexdens* aos 5 e 7 dias com as concentrações de sulfluramida (0,1% e 1,0%) confirma a ação retardada deste inseticida, do grupo químico das sulfonas fluoroalifáticas (Schnellmann e Manning 1990). Esse atraso se deve ao seu mecanismo de ação, quando essa molécula é quebrada no corpo do inseto, tornando-se um componente principal denominado DESFA (perfluorooctanossulfonamida). Essa molécula atua no processo de fosforilação oxidativa (respiração aeróbica), interrompendo a produção de adenosina trifosfato (ATP) nas mitocôndrias (Schnellmann e Manning 1990; Laranjeiro e Zanuncio 1995). Os comportamentos de movimentação e agressão de formigas operárias com sintomas de intoxicação por sulfluramida são devidos aos seus baixos

níveis de energia, que diminuem gradualmente e levam à morte (Schnellmann e Manning 1990; Britto et al. 2016). Assim, o efeito do inseticida na supressão de colônias é retardado mesmo com um grande número de formigas contaminadas.

Os números e pesos semelhantes de operárias mortas entre as concentrações de fipronil e sulfluramida nas iscas, apesar das diferenças na sobrevivência da colônia e no mecanismo de ação dos inseticidas, confirmam a eficiência desses inseticidas no controle de colônias de formigas cortadeiras (Nagamoto et al. 2004; Gandra et al. 2016). A maior quantidade de dejetos úmidos produzidos nas colônias com a aplicação de iscas tóxicas e a produção nula naquelas com operárias contaminadas topicamente se devem ao fato de as operárias interagirem, por meio de comportamentos de toque, limpeza mútua e autolimpeza e, conseqüentemente, tornaram-se contaminadas, levando à desorganização da colônia como um todo.

Interações sociais, limpeza mútua e autolimpeza, além do comportamento de tocar entre as operárias, são responsáveis pela rápida dispersão de inseticidas entre as companheiras de colônia, conforme observado em nosso experimento. Corroboramos assim a hipótese de que as interações sociais promovem a contaminação das companheiras de ninho, servindo de modelo para novos estudos sobre a contaminação das operárias com os princípios ativos de inseticidas.

Informações Suplementares: A versão online contém material suplementar disponível em <https://doi.org/10.1007/s13744-021-00927-6>

Agradecimentos: Agradecemos aos editores Eliane Fontes e Heraldo Vasconcelos, e aos dois revisores anônimos, pelos valiosos comentários do manuscrito.

Contribuições dos autores: Tarcísio Marcos Macedo Mota Filho, Luís Eduardo Pontes Stefanelli, Roberto da Silva Camargo, José Cola Zanuncio, Alexandre dos Santos, Luiz Carlos Forti e Carlos Alberto Oliveira de Matos; escreveram o manuscrito; Roberto da Silva Camargo e Luiz Carlos Forti conceberam e projetaram os experimentos; Tarcísio Marcos Macedo Mota Filho e Luis Eduardo Pontes Stefanelli realizaram os experimentos; Luiz Carlos Forti contribuiu com reagentes/materiais/ferramentas de análise. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Tarcísio Marcos Macedo Mota Filho e Luis Eduardo Pontes Stefanelli agradecem o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES — Código Financeiro 001). Luiz Carlos Forti agradece o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-PQ) (doação nº 301938/2017–2). José Cola Zanuncio agradece ao “Programa Cooperativo sobre Proteção Florestal (PROTEF) do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF)” pelo apoio financeiro.

Declarações de ética

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- Akhtar Y, Isman MB (2013) Horizontal transfer of diatomaceous earth and botanical insecticides in the common bed bug, *Cimex lectularius* L.; Hemiptera: Cimicidae. PLoS ONE 8: e75626.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075626>
- Andrade APP, Forti LC, Moreira AA, Boaretto MAC, Ramos VM, Matos CAO (2002) Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. Sociobiology 40:293–306
- Barbieri RF, Forti LC, Fuhihara RT, Nagamoto NS, Camargo RS (2009) Ant group effects on the insecticide and dye flow among *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers. Sociobiology 54:589–600.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J R Stat Soc Series B Stat Methodol 57:289–300. <https://doi.org/10.1111/j.25176161.1995.tb02031.x>
- Bos N, Lefèvre T, Jensen AB, D’Ettorre D (2011) Sick ants become unsociable. J Evol Biol 25:1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02425.x>
- Britto JS, Forti LC, Oliveira MA, Zanetti R, Wilcken CF, Zanuncio JC, Loeck AE, Caldato N, Nagamoto NS, Lemes PG, Camargo RS (2016) Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. Int J Res Env Std 3:11–92

- Buczowski G (2019) Trap–treat–release: horizontal transfer of fipronil in field colonies of black carpenter ants, *Camponotus pennsylvanicus*. *Pest Manag Sci* 75:2195–2201. <https://doi.org/10.1002/ps.5345>
- Buczowski G, Scherer CW, Bennett GW (2008) Horizontal transfer of bait in the German cockroach: indoxacarb causes secondary and tertiary mortality. *J Econ Entomol* 101:894–901. <https://doi.org/10.1093/jee/101.3.894>
- Buczowski G, Wossler TC (2019) Controlling invasive Argentine ants, *Linepithema humile*, in conservation areas using horizontal insecticide transfer. *Sci Rep* 9: 19495. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56189-1>
- Bueno OC, Fresneau D, Schineider OM, Silveira C, Bueno FC (2001) Fluxo de corantes hidrossolúveis e lipossolúveis no trato digestivo de operárias de *Atta sexdens* L. 1758 (Hymenoptera: Formicidae). In: *Anais do XV Encontro de Mirmecologia, Londrina, Brasil* 69–71.
- Caetano FH (1990) Morphology of the digestive tract and associated excretory organs of ants. In: Vander Meer RK, Jaffé K (eds) *Applied myrmecology: a world perspective*. Westview Press, Boulder, pp 119–132
- Camargo RS, Puccini C, Forti LC, Matos CAO (2017a) Allogrooming, self-grooming, and touching behavior: contamination routes of leaf-cutting ant workers using a fat-soluble tracer dye. *Insects* 9,8:59. <https://doi.org/10.3390/insects8020059>
- Camargo RS, Forti LC, Lopes JFS, Andrade APP, Ottati ALT (2007) Age polyethism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). *J Appl Entomol* 131:139–145. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01129.x>
- Camargo RS, Puccini C, Forti LC, Matos CAO (2017b) Behaviors in fungus garden cultivation: Routes of contamination of leaf cutting ant workers with fat-soluble tracer dye. *Int J Agric Innov Res* 5:555–560.
- Catalani GC, Camargo RS, Sousa KKA, Caldato N, Silva AAC, Forti LC (2020) Fat-soluble substance flow during symbiotic fungus cultivation by leaf-cutter ants. *Neotrop Entomol* 49:116–123. <https://doi.org/10.1007/s13744-019-00718-0>
- Colosimo EA, Giolo SR (2006). *Análise de Sobrevivência Aplicada*; Blucher: São Paulo, Brazil.

- Della Lucia TM, Gandra LC, Guedes RN (2014) Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag Sci* 70:14–23. <https://doi.org/10.1002/ps.3660>
- Eisner T (1957) A comparative morphological study of the proventriculus of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Bull. Mus. Comp. Zool.* 116: 439–490.
- Fernández-Marín H, Zimmerman JK, Rehner SA, Wcislo, WT (2006) Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci* 273: 1689–1695. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3492>
- Forti LC, Camargo RS, Andrade APP, Catalani GC, Sousa KKA, Silva AAC, Ramos VM (2019) Contamination route of leaf-cutting worker ants analyzed through a fat-soluble tracer dye in toxic bait. *Neotrop Entomol* 48:349–355. <https://doi.org/10.1007/s13744-018-0652-1>
- Forti LC, Andrade APP, Sousa KKA, Camargo RS, Matos CAO, Caldato N, Ramos VM (2020) Do workers from subspecies *Acromyrmex subterraneus* prepare leaves and toxic baits in similar ways for their fungus garden?. *Neotrop Entomol* 49:12–23. <https://doi.org/10.1007/s13744-019-00708-2>
- Gandra LC, Amaral KD, Couceiro JC, Della Lucia TM, Guedes RN (2016) Mechanism of leaf-cutting ant colony suppression by fipronil used in attractive toxic baits. *Pest Manag Sci* 72:1475–1481. <https://doi.org/10.1002/ps.4239>
- Garrett RW, Carlson KA, Goggans MS, Nesson MH, Shepard CA, Schofield RM (2015) Leaf processing behaviour in *Atta* leafcutter ants: 90% of leaf cutting takes place inside the nest, and ants select pieces that require less cutting. *R Soc Open Sci* 3:150111. <https://doi.org/10.1098/rsos.150111>
- Hölldobler B, Wilson EO (1990) *The ants*. Cambridge, Harvard University Press, 733p.
- Hughes WOH, Eilenberg J, Boomsma JJ, (2002) Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proc R Soc B* 269:1811–1819. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2113>
- Kaplan EL, Meier, P (1985) Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53:457–481
- Laranjeiro AJ, Zanuncio JC (1995) Avaliação da isca à base de sulfloramida no controle de *Atta sexdens rubropilosa* pelo processo dosagem única de aplicação. *IPEF* 48:144–152.

- Liang S, Cai J, Chen X, Jin Z, Zhang J, Huang Z, Tang L, Sun Z, Wen X, Wang C (2019). Larval aggregation of *Heortia vitessoides* Moore (Lepidoptera: Crambidae) and evidence of horizontal transfer of avermectin. *Forests* 10:331. <https://doi.org/10.3390/f10040331>
- Littledyke M, Cherrett JM (1976) Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). *Bull Entomol Res* 66:205–217. <https://doi.org/10.1017/S0007485300006647>
- Martin P, Bateson P (1986) *Measuring Behaviour: An Introctory Guide*; Cambridge University Press: New York, NY, USA.
- Meurville, MP, LeBoeuf, AC (2021). Trophallaxis: the functions and evolution of social fluid exchange in ant colonies (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol News* 31:1–30. https://doi.org/10.25849/myrmecol.news_031:001
- Moreira DDO, Bailez AV, Erthal JM, Bailez O, Carrera MP, Samuels RI (2010) Resource allocation among worker castes of the leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* through trophallaxis. *J Insect Physiol* 56:1665–1670. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.06.018>
- Moreira DDO, Dáttilo W, Morais V, Erthal M, Silva CP, Samuels RI (2015) Diet type modifies ingestion rates and trophallactic exchanges in leaf-cutting ants. *Entomol Exp Appl* 154:45–52. <https://doi.org/10.1111/eea.12254>
- Moreira DDO, Erthal M, Carrera MP, Silva CP, Samuels RI (2006) Oral trophallaxis in adult leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera, Formicidae). *Insect Soc* 53:345–348. <https://doi.org/10.1007/s00040-006-0879-4>
- Nagamoto NS, Forti LC, Andrade APP, Boaretto MAC, Wilcken CF (2004) Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 44:413-432.
- Paul, J., and F. Roces. 2003. Fluid intake rates in ants correlate with their feeding habits. *J Insect Physiol* 49: 347–357.
- R core team (2020) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Accessed 06 December 2020
- Rust MK, Reiersen DA, Klotz JA (2004) Delayed toxicity as a critical factor in the efficacy of aqueous baits for controlling Argentine ants (Hymenoptera:

Formicidae). *J Econ Entomol* 97: 1017–1024.

<https://doi.org/10.1093/jee/97.3.1017>

Rust MK, Saran RK (2006) Toxicity, repellency, and transfer of chlorfenapyr against western subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *J Econ Entomol* 99:864–872. <https://doi.org/10.1093/jee/99.3.864>

Schnellmann RG, Manning RO (1990) Perfluorooctane sulfonamide: a structurally novel uncoupler of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1016:344–348. [https://doi.org/10.1016/00052728\(90\)90167-3](https://doi.org/10.1016/00052728(90)90167-3)

Schultz TR, Mueller UG, Currie CR, Rehner SA (2005) *Reciprocal Illumination a Comparison of Agriculture in Humans*; Oxford University Press: England, UK.

Silva LC, Camargo RS, Forti LC, Matos CAO, Travaglini RV (2015) Do *Atta sexdens rubropilosa* workers prepare leaves and bait pellets in similar ways to their symbiotic fungus? *Sociobiology* 62:484–493.

Soeprono AM, Rust MK (2004) Effect of horizontal transfer of barrier insecticides to control Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *J Econ Entomol* 97:1675–1681. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-97.5.1675>

Soroker V, Vienne C, Hefetz A (1995) Hydrocarbon dynamic within e between nestmates in *Cataglyphis niger* (Hymenoptera: Formicidae). *J Chem Ecol* 21:365–378. <https://doi.org/10.1007/BF02036724>

Sousa KKA, Camargo RS, Forti LC (2017) Communication or toxicity: what is the effect of cycloheximide on leaf-cutting ant workers?. *Insects* 8:126. <https://doi.org/10.3390/insects8040126>

Souza DJ, Van Vlaenderen J, Moret Y, Lenoir A (2008) Immune response affects ant trophallactic behaviour. *J Insect Physiol* 54:828–832. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.03.001>

Theis FJ, Ugelvig LV, Marr C, Cremer S (2015) Opposing effects of allogrooming on disease transmission in ant societies. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 370:20140108. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0108>

Tomlin CDS (2000) *The pesticide manual*, 12th ED. Farnham, Surrey, United Kingdom: British Crop Protection Council.

Vander Meer RK, Lofgren CS, Williams DF (1985) Fluoroaliphatic sulfones: a new class of delayed-action insecticides for control of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol* 78: 1190–1197. <https://doi.org/10.1093/jee/78.6.1190>

- Vinha GL, Alcántara-de la Cruz R, Della Lucia TMC, Wilcken CF, Silva ED, Lemes PG, Zanuncio JC (2020) Leaf-cutting ants in commercial forest plantations of Brazil: biological aspects and control methods. *South For J For Sci* 82:95–103. <https://doi.org/10.2989/20702620.2019.1639596>
- Walker TN, Hughes WO (2009) Adaptive social immunity in leaf-cutting ants. *Biol Lett* 5:446–448. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0107>
- Zanetti R, Zanuncio JC, Santos JC, Silva WLP, Ribeiro GT, Lemes PG (2014) An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. *Forests* 5:439–454. <https://doi.org/10.3390/f50304>

Anexo

Neotropical Entomology

Comportamento de Limpeza Mútua, Autolimpeza e Toque Como um Mecanismo Para Dispersar Inseticidas Dentro das Colônias de Uma Formiga Cortadeira

Tarcísio Marcos Macedo Mota Filho^{1*}, Roberto da Silva Camargo¹, Luis Eduardo Pontes Stefanelli¹, José Cola Zanuncio², Alexandre dos Santos³, Carlos Alberto Oliveira de Matos⁴, Luiz Carlos Forti¹

¹ Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

² Departamento de Entomologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

³ Laboratório de Fitossanidade (FitLab), Instituto Federal de Mato Grosso - IFMT, Cáceres, MT, Brasil.

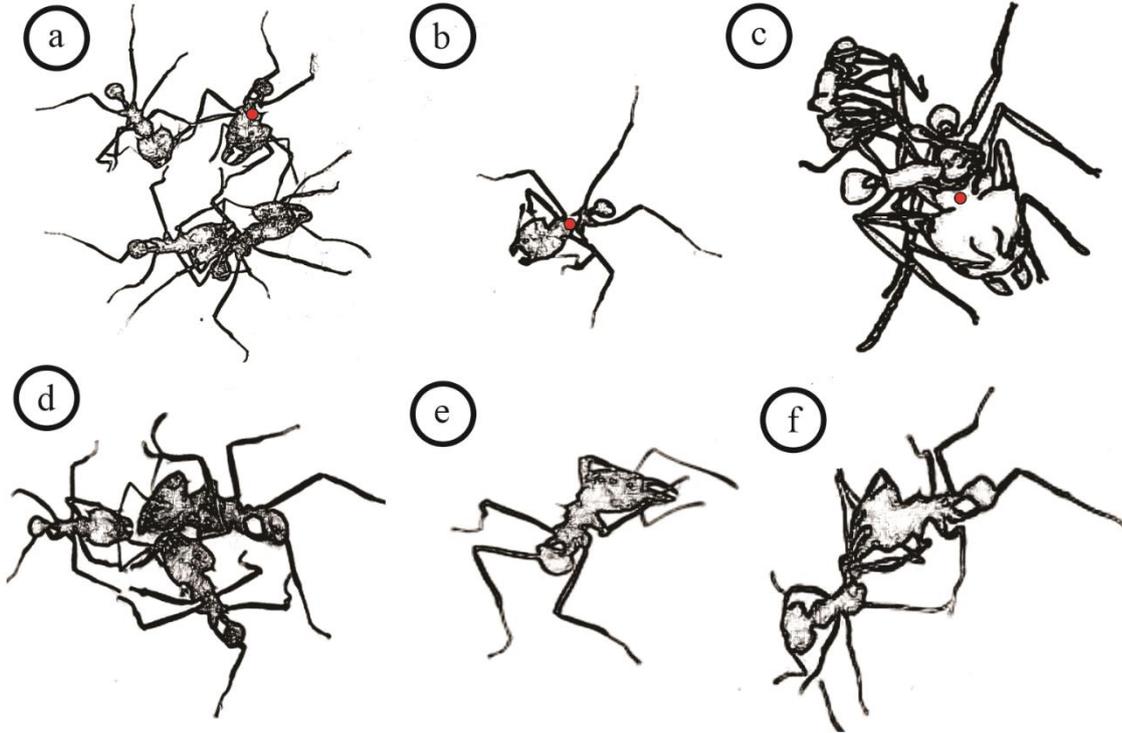
⁴ Campus Experimental de Itapeva, UNESP, Itapeva, SP, Brasil.

***Autor correspondente:** tarcisio972010@hotmail.com ORCID: 0000-0002-2157-261X

Material complementar 1. Tabela descritiva dos tratamentos e controles usados na série experimental

Descrição dos tratamentos	Colônias por tratamento
T1 – Fipronil 0,1% (3 operárias contêm 0,03 mg de i.a)	4 Colônias
T2 – Controle (3 operárias contaminadas topicamente com 1 µl de óleo vegetal)	4 Colônias
T3 – Fipronil 0,01% (30 operárias contêm 0,03 mg de i.a)	4 Colônias
T4 – Controle (30 operárias contaminadas topicamente com 1 µl de óleo vegetal)	4 Colônias
T5 – Sulfluramida 0,1% (60 operárias contêm 0,03 mg de i.a)	4 Colônias
T6 – Controle (60 operárias contaminadas topicamente com 1 µl de óleo vegetal)	4 Colônias
T7 – Sulfluramida 0,01% (600 operárias contêm 0,03 mg de i.a)	4 Colônias
T8 – Controle (operárias contaminadas topicamente com 1 µl de óleo vegetal)	4 Colônias
T9 – Isca fipronil (0,01% i.a)	4 Colônias
T10 – isca sulfluramida (0,2% i.a)	4 Colônias
T11 – Controle isca (96% de polpa cítrica e 4% de óleo vegetal)	4 Colônias
Total de colônias	44 Colônias

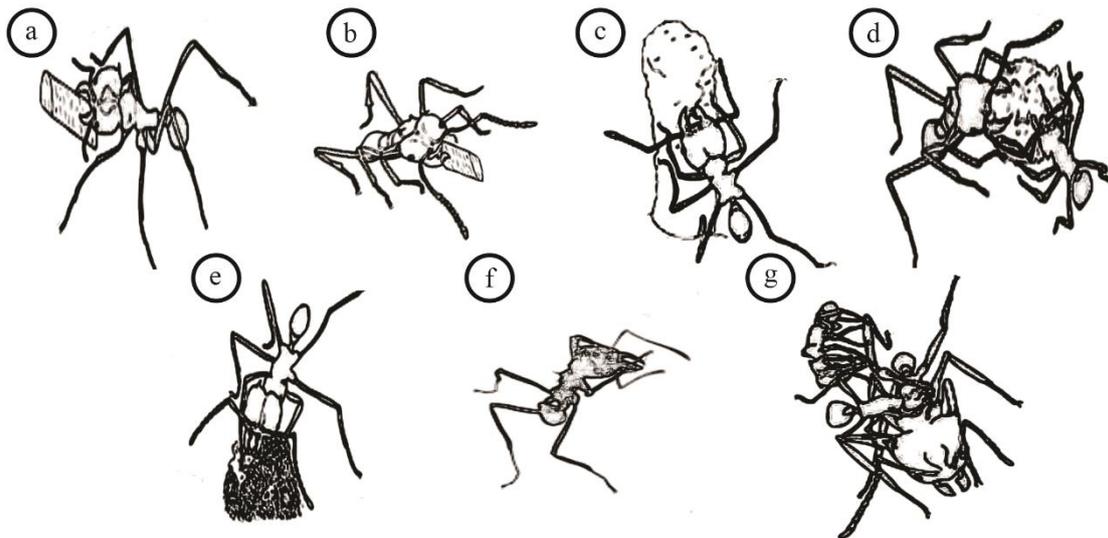
Material complementar 2. Comportamentos de operárias *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae): (a) Toque; (b) autolimpeza; (c) limpeza mútua; (d) Toque 2; (e) auto limpeza 2; (f) limpeza mútua 2.



Material complementar 3. Links dos vídeos de comportamentos realizados por operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).

(i) toque - Toque entre a operária contaminada com as demais (<https://youtu.be/cEzq1bqbbAs>); (ii) autolimpeza - autolimpeza da operária contaminada (<https://youtu.be/2TZt9k3j14M>); (iii) Limpeza mutua- limpeza da operária contaminada pelas demais (<https://youtu.be/29F0Siv1XNA>); (iv) toque 2- toques entre as operárias sem inseticida (<https://youtu.be/U4QZtC8zFok>); (v) auto limpeza 2- auto limpeza das operárias sem inseticida (<https://youtu.be/YqCXZ8CZP5s>); (vi) limpeza mútua 2- limpeza entre as operárias sem inseticida (https://youtu.be/d-kGLk24_oU).

Material complementar 4. Comportamentos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) durante a preparação de iscas tóxicas a serem incorporadas ao jardim de fungo: (a) Transportar do pellet; (b) Segurar o pellet; (c) lamber o pellet; (d) fragmentar o pellet; (e) Incorporar o pellet; (f) autolimpeza; e (g) limpeza mútua.



Material complementar 5. Frequência de comportamentos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) com aplicação tópica de duas concentrações do inseticida fipronil (Fip.), Sulfluramida (Sulf.) e o respectivo controle. As medianas por linha não diferem pelo Wilcoxon Ranks Sum Test ($\alpha = 0,05$).

Tratamento	Sulf. 0,1%	Controle	<i>p</i> -value	Sulf. 1,0%	Controle	<i>p</i> -value
Autolimpeza	220,0	224,5	0,886	180,0	173,5	0,059
Limpeza mútua	249,0	243,5	0,886	229,0	222,5	0,686
Toque	301,0	312,5	0,486	258,5	247,5	0,191
Autolimpeza 2	189,0	199,0	0,343	151,5	141,0	0,309
Limpeza mútua 2	206,5	214,5	0,343	183,0	189,5	0,486
Toque 2	298,5	287,5	0,486	253,0	261,5	0,191
Total	1472,5	1495,0	1,000	1227,5	1229,5	1,000
Tratamento	Fip. 0,1%	Controle	<i>p</i> -value	Fip. 1,0%	Controle	<i>p</i> -value
Auto limpeza	105,5	114,5	0,343	8,5	13,0	0,309
Limpeza mútua	144,5	136,5	0,486	15,0	13,0	0,663
Toque	219,0	208,5	0,343	21,0	23,5	0,772
Autolimpeza 2	94,5	98,5	0,486	52,5	62,0	0,468
Limpeza mútua 2	148,0	146,5	0,663	120,0	114,5	0,686
Toque 2	232,0	226,0	0,343	214,5	205,5	0,200
Total	934,0	920,5	0,772	441,0	438,0	0,384

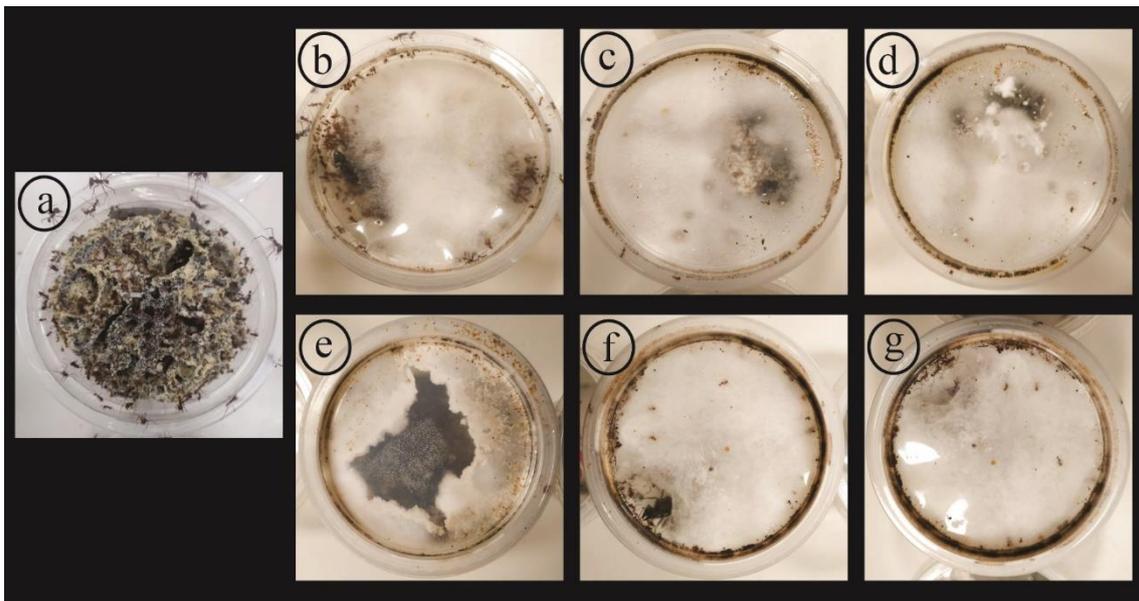
Material complementar 6. Frequências comportamentais de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) com aplicação tópica de duas concentrações dos inseticidas fipronil (Fip.) e sulfluramida (Sulf.). As medianas seguidas por letras diferentes por linha diferem pelo teste de soma de postos de Wilcoxon aos pares com o ajuste dos valores de P ($\alpha = 0,05$).

Tratamento	Fip. 0,1%	Fip. 1,0%	Sulf. 0,1%	Sulf. 1,0%	Kruskal- Wallis p - valor
Autolimpeza	105,5 c	8,5 d	220,0 a	180,0 b	0,003
Limpeza mútua	144,5 b	15,0 c	249,0 a	229,0 a	0,004
Toque	219,0 b	21,0 c	301,0 a	258,5 b	0,004
Autolimpeza 2	94,5 b	52,5 b	189,0 a	151,5 a	0,005
Limpeza mútua 2	148,0 b	120,0 c	206,5 a	183,0 a	0,005
Toque 2	232,0 c	214,5 c	298,5 a	253,0 b	0,004
Total	934 c	441 d	1472,5 a	1227 b	0,003

Material complementar 7. Comportamento de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) durante o preparo de iscas tóxicas com os inseticidas fipronil e sulfluramida e no controle para incorporação no jardim de fungos. As medianas por linha não diferem pelo Wilcoxon Ranks Sum Test com o ajuste dos valores P ($\alpha = 0,05$)

Tratamento	Fipronil	Sulfluramida	Controle	Kruskal-Wallis p -valor
Transportar o pellet	37,0	32,5	30,5	0,578
Segurar o pellet	19,0	22,0	20,0	0,159
Lamber o pellet	215,0	223,0	220,5	0,435
Fragmentar o pellet	31,0	34,0	32,0	0,618
Incorporar o pellet	29,5	35,5	32,5	0,201
Autolimpeza	51,0	56,0	52,5	0,076
limpeza mútua	139,0	123,0	131,5	0,435
Total	516,0	541,5	526,0	0,165

Material complementar 8. Colônias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae): (a) Colônia saudável (Controle); (b) Colônia morta com iscas tóxicas (fipronil 0,01%); operária contaminada (fipronil 0,1%) (c); operária contaminada (fipronil 1,0%) (d); isca tóxica (sulfluramida 0,2%) (e); operária contaminada (sulfluramida 0,1%) (f); operária contaminada (sulfluramida 1,0%) (g). O fungo parasita *Escovopsis* spp, estava presente nas colônias controladas com as duas concentrações dos inseticidas (isca e aplicação tópica)



Material complementar 9. Valor *P* das comparações múltiplas de curvas de sobrevivência de colônias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em função de duas concentrações [aplicação tópica (T) e iscas tóxicas (I)] com os inseticidas fipronil (Fip,) ou sulfluramida (Sulf,)

Tratamento	Fip, 0,1% (T)	Fip, (I)	Fip, 1,0% (T)	Sulf, (I)	Sulf, 0,1% (T)	Sulf,1,0% (T)
Fipronil 0,1% (T)	-					
Fipronil (I)	0,014	-	-	-	-	
Fipronil 1,0% (T)	0,014	-	-	-	-	
Sulfluramida (I)	0,014	0,014	0,014	-	-	
Sulfluramida 0,1% (T)	0,014	0,317	0,317	0,014	-	
Sulfluramida 1,0% (T)	0,014	0,051	0,051	0,014	0,207	-

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo verificou que os atos comportamentais são os principais meios de contaminação das operárias pelos ingredientes ativos, evidenciando a importância dos comportamentos de contato direto e indireto com as iscas para a contaminação.

O modo de ação dos ingredientes ativos, nas concentrações de sulfluramida e fipronil estudadas, influencia a quantidade e velocidade de contaminação das operárias, sendo mais rápidas nas concentrações de fipronil.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. P. P. *et al.* Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology**, v. 40, n. 2, p. 293-306, 2002.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. **Perspectivas no controle de formigas cortadeiras**. Série técnica IPEF, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.
- BOLTON B. *et al.* **Bolton's catalogue of the ants of the world: 1758–2005**. Cambridge: Harvard University Press, 2007.
- BRITTO, J. S. *et al.* Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Research in Environmental Studies**, v. 3, p. 11-92, 2016.
- CAMARGO, R. S. *et al.* Allogrooming, self-grooming, and touching behavior: contamination routes of leaf-cutting ant workers using a fat-soluble tracer dye. **Insects**, v. 8, n. 2, p. 59, 2017. doi.org/10.3390/insects8020059
- CASTRO, M. M. *et al.* Formigas em ambientes urbanos: importância e risco à saúde pública. **Ces Revista**, v. 28, n. 1, p. 103-117, 2014.
- CRISTIANO, M. P. *et al.* *Amoimyrmex* Cristiano, Cardoso & Sandoval, gen. nov. (Hymenoptera: Formicidae): a new genus of leaf-cutting ants revealed by multilocus molecular phylogenetic and morphological analyses. **Austral Entomology**, v. 59, n. 4, 643-676, 2020. doi.org/10.1111/aen.12493
- DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas-Cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: UFV, 2011. 419 p.
- FORTI, L. C. *et al.* Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 50, n. 3, p. 1149-1164, 2007.
- FORTI, L. C. *et al.* Trofalaxia entre operárias-operárias e operárias-larvas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). Resumos do 14^o Congresso Brasileiro de Entomologia, Piracicaba, SP. **Anais...Piracicaba**: 1993.
- GARCIA, I. P. *et al.* Ecological interaction between *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) and the vegetation of a mesophyll semideciduous forest fragment in Botucatu, SP, Brazil. **Sociobiology**, v. 42, n. 2, p. 265-283, 2003.
- MOREIRA, D. D. O. *et al.* Diet type modifies ingestion rates and trophallactic exchanges in leaf-cutting ants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 154, n. 1, p. 45-52, 2015. doi.org/10.1111/eea.12254
- MOREIRA, D. D. O. *et al.* Oral trophallaxis in adult leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes sociaux**, v. 53, n. 3, p. 345-348, 2006. doi.org/10.1007/s00040-006-0879-4

MUELLER, U. G. *et al.* Phylogenetic patterns of ant–fungus associations indicate that farming strategies, not only a superior fungal cultivar, explain the ecological success of leafcutter ants. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 10, 2414–2434, 2018. doi.org/10.1111/mec.14588.

NAGAMOTO, N. S. *et al.* Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 44, n. 2, p. 413-432, 2004.

NYAMUKONDIWA, C.; ADDISON, P. Preference of foraging ants (Hymenoptera: Formicidae) for bait toxicants in South African vineyards. **Crop Protection**, v. 30, n. 8, p. 1034-1038, 2011. doi.org/10.1016/j.cropro.2011.03.014

SILVA, A. *et al.* Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 4, p. 307-313, 2003. doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00004-0

WARD, P. **Taxonomy, phylogenetics, and evolution**. Chapter, 2010.

WEBER, N. A. The fungus-culturing behavior of ants. **American Zoologist**, v. 12, n. 3, p. 577-587, 1972.