

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AÇÃO TÓXICA DE INGREDIENTES ATIVOS EM *Atta sexdens*
rubropilosa Forel, 1908 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) VISANDO
SEU EMPREGO EM ISCAS FORMICIDAS**

MARCÍLIO DE SOUZA SILVA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU – SP
Novembro - 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AÇÃO TÓXICA DE INGREDIENTES ATIVOS EM *Atta sexdens*
rubropilosa Forel, 1908 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) VISANDO
SEU EMPREGO EM ISCAS FORMICIDAS**

MARCÍLIO DE SOUZA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Forti
Co-orientador: Dr. Nilson Satoru Nagamoto

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU – SP
Novembro – 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Silva, Marcílio de Souza, 1983-
S586a Ação tóxica de ingredientes ativos em *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) visando seu emprego em iscas formicidas / Marcílio de Souza Silva.
Botucatu : [s.n.], 2012
 xii, 86 f. : il., grafs., tabs.

 Tese(doutorado)- Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012
 Orientador: Luiz Carlos Forti
 Co-Orientador: Nilson Satoru Nagamoto
 Inclui bibliografia

 1. Formiga-cortadeira. 2. Inseticidas. 3. Formiga - cortadeira - Controle. I. Forti, Luiz Carlos.II. Nagamoto, Nilson Satoru. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu).Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "AÇÃO TÓXICA DE INGREDIENTES ATIVOS EM *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) VISANDO SEU EMPREGO EM ISCAS FORMICIDAS"

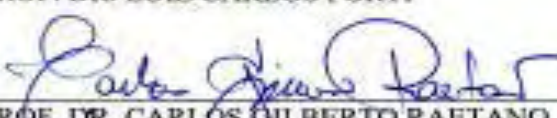
ALUNO: MARCÍLIO DE SOUZA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CARLOS FORTI
COORIENTADOR: DR. NILSON SATORU NAGAMOTO

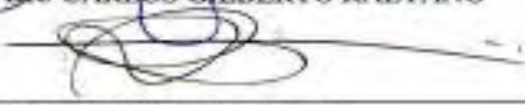
Aprovado Pela Comissão Examinadora



PROF. DR. LUIZ CARLOS FORTI



PROF. DR. CARLOS GILBERTO RAETANO



PROF. DR. ANDRE RODRIGUES



PROFA. DRA. MARIA APARECIDA CASTELLANI



PROFA. DRA. VANIA MARIA RAMOS

Data da Realização: 23 de novembro de 2012.

“A ciência não pode prever o que vai acontecer. Só pode prever a probabilidade de algo acontecer” (César Lattes).

OFEREÇO

A Deus, pela criação da vida.

*À minha querida mãe, Valci Francisca de Souza Santos,
por todo amor, incentivo e colaboração.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista, através da Coordenação de Pós-Graduação em Agronomia/Proteção de Plantas, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Forti, pela orientação, amizade, apoio e grande contribuição na minha vida acadêmica; minha eterna gratidão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa de estudo.

Aos meus queridos irmãos: Marcos Paulo Souza de Almeida, Cícero Carlos Souza de Almeida e Moana Vitória de Souza Silva, por torcerem pelo meu sucesso.

À minha amada Nayane Michelle Bezerra dos Santos, pelo carinho, amor, apoio e incentivo nesta reta final do curso de pós-graduação.

Aos meus colegas do Laboratório de Insetos Sociais-Praga: Nilson Nagamoto, Roberto Camargo, Ricardo Fujihara, Rafael Barbieri, Sandra Cardoso, Sinara Moreira, Nádia Caldato, Mariana Brugger, Paula Dias, Tierla Barros, Lais Silva, Raphael Travaglini e Maria Alves.

Aos colegas da pós-graduação: Anthony Almeida, Cícero Costa, Wilson Dourado, Saulo Almeida, Hermeson Vitorino, Ricardo Ferreira, Marlon Rocha, Plácido Melo, Carlos Silva, Pedro Bento, Leonardo Barbosa, Sihélio Cruz, Silvia Cruz, Adriana Tanaka, Hélio Moreira, Josué Ferreira, Givaldo Neto, Rafael Pombo, Lucas Holanda, Mikael Rodrigues e Adriano Santos, pelo companheirismo e convívio.

Aos professores: Dr. Carlos Gilberto Raetano, Dr. Carlos Frederico Wilcken, Dr. Luiz Carlos Forti, Dr. Edson Luiz Lopes Baldin, Dr. Edson Luiz Furtado, Dra. Marli Teixeira de A. Minhoni e Dr. Luiz Carlos Luchini, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao técnico de laboratório, David Generoso, pelo apoio e convívio.

Aos funcionários da Biblioteca “Prof. Paulo de Carvalho Mattos” (FCA/UNESP) pelo atendimento e colaboração.

A todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram com a realização desta tese.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	XI
SUMMARY	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 As formigas-cortadeiras	3
2.1.1 Importância econômica	4
2.2 Formigas-cortadeiras e seu fungo simbiote <i>versus</i> fungos associados ..	5
2.3 Controle químico de formigas-cortadeiras	6
2.4 Características desejadas de princípios ativos	7
2.5 Ingredientes ativos.....	8
2.5.1 Sulfluramida	8
2.5.2 Fipronil	9
2.5.3 Indoxacarbe	9
2.5.4 Imidaclopride	10
2.5.5 Diafentiuron	10
3 CAPÍTULOS	12
I – PREVALÊNCIA DO FUNGO <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> (BASIDIOMYCOTA: AGARICALES) E CONTAMINAÇÃO DE OPERÁRIAS APÓS APLICAÇÃO DE FIPRONIL E SULFLURAMIDA EM <i>Atta sexdens</i> <i>rubropilosa</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)	12
Resumo	13
1.1 Introdução	15
1.2 Material e Métodos	16
1.3 Resultados	19
1.4 Discussão	25
1.5 Conclusão	27

II – TOXICIDADE TÓPICA DE INGREDIENTES ATIVOS EM <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)	29
Resumo	30
2.1 Introdução	32
2.2 Material e Métodos	33
2.3 Resultados	35
2.4 Discussão	39
2.5 Conclusão	41
III - MORTALIDADE DE OPERÁRIAS DE <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) APÓS PROCESSO DE FOTÓLISE DE DIAFENTIURON	43
Resumo	44
3.1 Introdução	46
3.2 Material e Métodos	47
3.3 Resultados	49
3.4 Discussão	54
3.5. Conclusão	56
IV – APLICAÇÃO DE ISCAS GRANULADAS CONTENDO DIAFENTIURON EM COLÔNIAS DE <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)..	58
Resumo	59
4.1 Introdução	61
4.2 Material e Métodos	62
4.3 Resultados	64
4.4 Discussão	70
4.5. Conclusão	74
4 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE FIGURAS

	Página
Capítulo I	
Figura 1. Frequência absoluta de fungos após aplicação de ingredientes ativos em colônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> . A: grupo de ação rápida; B: grupo de ação retardada	20
Capítulo II	
Figura 1. Estimativas de mortalidade (%) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> em função de ingredientes ativos e diferentes níveis de doses estudadas	38
Capítulo III	
Figura 1. Evolução dos sintomas de intoxicação após a indução de ingestão de sulfluramida (formicida padrão) e diafentiuron (diferentes níveis de exposição à luz UV) em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	53
Capítulo IV	
Figura 1. Ilustração e descrição da escala de notas no corte de folhas de <i>Acalypha</i> sp. por operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	64
Figura 2. Carregamento de folhas de <i>Acalypha</i> sp. da câmara de forrageamento das colônias por operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> após aplicação dos tratamentos	65
Figura 3. Incorporação de substrato vegetal na cultura de fungo por operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> após aplicação dos tratamentos	66

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo I	
Tabela 1. Avaliação da porcentagem de glândula pós-faríngea (GPF) corada de acordo com o ingrediente ativo e casta de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	21
Tabela 2. Porcentagem estimada da glândula pós-faríngea (GPF) corada de operárias, empregando-se regressão logística, após aplicação de iscas tóxicas em colônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	23
Tabela 3. Fungos associados isolados de colônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> após aplicação de ingredientes ativos	24
Capítulo II	
Tabela 1. Valores de DL ₅₀ de ingredientes ativos aplicados por contato em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	35
Tabela 2. Valores de TL ₅₀ de ingredientes ativos aplicados por contato em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	36
Tabela 3. Eficiência de controle pela aplicação de ingredientes ativos em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> após 21 dias de aplicação por contato	37
Capítulo III	
Tabela 1. Porcentagem da mortalidade acumulada de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> após oferecimento de isca pastosa contendo sulfluramida (formicida padrão) e diafentiuron (diferentes níveis de exposição à luz UV) de acordo com o período de avaliação	51
Tabela 2. Porcentagem média da mortalidade acumulada de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> após oferecimento de isca pastosa contendo sulfluramida (formicida padrão) e diafentiuron (diferentes níveis de exposição à luz UV)	52
Tabela 3. Valores de TL ₅₀ de sulfluramida (formicida padrão) e diafentiuron (diferentes níveis de exposição à luz UV) aplicados por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	54

Capítulo IV

Tabela 1. Notas atribuídas ao corte de folhas de <i>Acalypha</i> sp. por operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> após aplicação dos tratamentos	67
Tabela 2. Evolução dos tratamentos de acordo com o período de avaliação após aplicação de iscas, utilizando a escala de nota de corte de folhas de <i>Acalypha</i> sp. (0 a 4) por operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	68
Tabela 3. Massa da câmara de fungo de colônias jovens (8 meses) de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> após 21 dias da aplicação de tratamentos	69
Tabela 4. Estado geral das colônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> após o tratamento com iscas	70

RESUMO

As formigas-cortadeiras são insetos sociais de grande importância agrícola devido ao seu ataque danoso aos diversos sistemas produtivos. Pertencem à tribo Attini e cultivam um fungo simbiote utilizado como alimento, a qual é considerada uma grande comunidade microbiana. Entretanto, estudos sobre o efeito da aplicação de ingredientes ativos em operárias isoladas e colônias de *A. sexdens rubropilosa* têm sido frequentes, mas não tem apresentado resultados satisfatórios para serem empregados no controle destes insetos. Sendo assim, o trabalho teve como objetivos: (1) avaliar o efeito de ingredientes ativos de formicidas comerciais sobre a micota de *A. sexdens rubropilosa*; (2) avaliar a toxicidade tópica de novos ingredientes ativos em operárias de *A. sexdens rubropilosa*; (3) avaliar a mortalidade de operárias de *A. sexdens rubropilosa* após o processo de fotólise de diafentiuron; (4) avaliar o efeito de diafentiuron adicionado em isca granulada após o processo de fotólise em colônias de *A. sexdens rubropilosa*. Foram utilizadas colônias de laboratório submetidas aos diferentes experimentos com aplicação de ingredientes ativos. Desta forma, obtiveram-se os seguintes resultados: (1) houve prevalência do fungo simbiote, demonstrando que não ocorre o sinergismo quando se aplica isca formicida; (2) diafentiuron apresentou ação tópica retardada, mostrando-se um ingrediente ativo promissor para iscas tóxicas; (3) após o processo de fotólise, diafentiuron apresentou mortalidade de operárias acima de 80% entre o terceiro e quinto dia após a aplicação; (4) tratamentos contendo diafentiuron (2h e 6h) conseguiram reduzir o corte de folhas e a massa do jardim de fungo, mas não levaram as colônias de *A. sexdens rubropilosa* à morte.

Palavras-chave: formigas-cortadeiras, inseticida, isca, controle.

TOXIC ACTION OF ACTIVE INGREDIENTS ON *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) AIMING THE EMPLOYMENT IN FORMICIDE BAIT. Botucatu, 2012, 86p. Thesis (Ph.D. in Agronomy/Plant Protection) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MARCÍLIO DE SOUZA SILVA

Advisor: LUIZ CARLOS FORTI

Co-Advisor: NILSON SATORU NAGAMOTO

SUMMARY

Leaf-cutting ants are social insects of agricultural importance due to its damaging attack to the various production systems. These insects Attini and cultivate a symbiotic fungus for food, which is considered a major microbial community. However, studies on the effect of active ingredients in isolated workers and colonies of *A. sexdens rubropilosa* have been frequent, but have not shown satisfactory results to be used to control these insects. Thus, the study aimed to: (1) evaluate the effect of active ingredients of formicides commercials on the mycota of *A. sexdens rubropilosa*, (2) evaluate the toxicity of new active topical ingredients on workers of *A. sexdens rubropilosa*, (3) evaluate the mortality of *A. sexdens rubropilosa* workers after the process of photolysis of diafenthiuron, (4) evaluate the effect of diafenthiuron added to granulated bait after the process of photolysis in *A. sexdens rubropilosa* colonies. We used laboratory colonies submitted to different experiments with application of active ingredients. Thus, the following results were obtained: (1) there was prevalence of symbiotic fungus, demonstrating that no synergism occurs when applying formicidal bait; (2) diafenthiuron showed topical delayed action, showing a promising active ingredient for toxic baits; (3) after the process of photolysis, diafenthiuron show mortality of workers above 80% between the third and fifth day after application; (4) treatments containing diafenthiuron (2 and 6h) managed to reduce the cutting leaves and mass of the fungus garden, but led the colonies of *A. sexdens rubropilosa* to death.

Keywords: leaf-cutting ants, insecticide, bait, control.

1 INTRODUÇÃO

Formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são reconhecidas por alimentarem-se de seu jardim de fungo e, principalmente, por cortarem e carregarem folhas, flores e sementes para incorporarem nesse jardim (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; ANDRADE et al., 2002). Dentre estas, a espécie *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, popularmente conhecida como saúva-limão, encontra-se bem distribuída em alguns estados brasileiros (DELLA LUCIA, 2011).

Esta formiga ataca diversas culturas de relevante importância agrícola, extraíndo partes de plantas e provocando redução significativa da produção, principalmente em plantios comerciais de espécies florestais (ZANETTI et al., 2003c, 2004). Por ser considerada uma praga em potencial e representar bem este grupo de insetos desfolhadores é que esta espécie tem sido frequentemente utilizada como modelo de estudo no desenvolvimento de novos formicidas, com a finalidade de serem usados para permitir seu controle, reduzindo assim as perdas causadas por sua atividade forrageira (NAGAMOTO et al., 2004, 2007).

Estes formicidas têm sido desenvolvidos para serem empregados na forma de isca granulada, pois é a principal técnica de controle que tem demonstrado eficiência na redução de danos causados por estas formigas (FORTI et al., 2007). Entretanto, segundo Forti et al. (1998), seu desenvolvimento em escala industrial, com adição de ingredientes ativos conhecidos pode ser considerado relativamente recente, pois somente a partir de 1960 é que foram testadas com resultados satisfatórios. Desde então, diversos estudos foram

realizados não somente com a finalidade de tornar esta técnica cada vez mais eficiente, como também reduzir sua agressão aos agroecossistemas (BOARETTO; FORTI, 1997).

A maior parte destes estudos se depara com a dificuldade de encontrar um bom formicida, pois além de eficiente contra as formigas, deve conter características físico-químicas que reduzam seu efeito tóxico ao meio ambiente como, por exemplo, o tempo necessário para que ocorra sua degradação após a aplicação no campo (BOARETTO; FORTI, 1997; FORTI et al., 1998). Um exemplo de ingrediente ativo cujo uso como formicida foi proibido são os clorados (dodecacloro, aldrin e heptacloro) (NAKANO, 1994), devido ao seu poder residual muito elevado, persistindo no ambiente por muitos anos, podendo contaminar o homem e animais, sendo substituído pela sulfluramida (LARANJEIRO; ZANUNCIO, 1995).

Por isso, pesquisas que visem à descoberta ou que ao menos possam servir de subsídios científicos para o desenvolvimento de novos ingredientes ativos para serem empregados em iscas formicidas são de extrema importância, pois permitem o uso de produtos fitossanitários seguros e eficientes, tornando-se uma opção de controle economicamente viável para os produtores rurais.

Sendo assim, o principal objetivo desta tese foi avaliar a toxicidade de ingredientes ativos sobre as colônias, suas operárias (isoladas) e seu consórcio microbiano em formigas-cortadeiras, utilizando a espécie *A. sexdens rubropilosa* como modelo de estudo devido à relativa facilidade de mantê-la em condições de laboratório, permitindo a execução de bioensaios.

Para tanto, foram levantadas algumas hipóteses e analisadas de acordo com cada capítulo desta tese: *i)* ocorre prevalência de fungo associado (não simbiote) em colônias após aplicação de iscas tóxicas; *ii)* existe toxicidade tóxica de ingredientes ativos em operárias; *iii)* ocorre mortalidade de operárias por ingestão de diafenthiuron após fotólise e; *iv)* ocorre mortalidade de colônias por diafenthiuron após fotólise quando adicionado em isca granulada. Com a avaliação destas hipóteses, pretende-se fornecer informações quanto à ação tóxica de ingredientes ativos empregados em iscas granuladas, contribuindo para o controle químico de formigas-cortadeiras na perspectiva de reduzir os danos às culturas agrícolas e ao ambiente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 As formigas-cortadeiras

As formigas são organismos dominantes na maioria dos ecossistemas terrestres, apresentando importantes papéis no fluxo de energia e nutrientes. Estas participam da aeração do solo, polinização e dispersão de sementes. Representam o grupo de insetos mais amplamente distribuído e numericamente abundante (SILVESTRE, 2000).

As formigas-cortadeiras pertencem à família Formicidae, subfamília Myrmicinae, tribo Attini e compreendem mais de 250 espécies catalogadas, incluídas em 16 gêneros, apesar da dúvida sobre o gênero *Pseudoatta* que é considerado como sinônimo de *Acromyrmex* (BRANDÃO et al., 2011). Elas ocorrem em muitos países do novo mundo, com exceção do Chile e das ilhas de Cuba e Trinidad e Tobago (MICHELS et al., 2001). Todas as Attini cultivam um fungo que é a principal fonte alimentar das larvas e que também constitui parte da alimentação dos adultos (MUELLER, 2002; SILVA et al., 2003). Entretanto, no Brasil as formigas dos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) têm maior importância agrícola.

Ambos os gêneros têm sido descritos como os herbívoros dominantes da Região Neotropical, consumindo muito mais vegetação que qualquer outro grupo de animais de diversidade taxonômica comparável, com a inclusão também de mamíferos, hemípteros e lepidópteros (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Encontram-se distribuídos por todo o território nacional e com intensa atividade durante o ano, atacando várias culturas agrícolas, pastagens e, em particular, os

reflorestamentos (HERNANDEZ; JAFFÉ, 1995), desde as plantas em viveiros até o campo definitivo (ZANETTI et al., 2003b).

2.1.1 Importância econômica

As formigas-cortadeiras utilizam diversas plantas para cultivar o fungo do qual se alimentam. Elas podem cortar flores e folhas ou utilizar porções já desprendidas. São conhecidas pela complexidade de suas preferências, dependentes, em parte, das características físicas dos vegetais (REIS FILHO et al., 2007). Parâmetros químicos e físicos influenciam na aceitação desses materiais pelas formigas (FOWLER; STILES, 1980). De modo geral, as formigas-cortadeiras têm preferência pelas partes tenras das plantas (REIS FILHO et al., 2007).

Segundo Amante (1967), dez saúvas adultos ha^{-1} cortam aproximadamente 21 Kg de folhas dia^{-1} , reduzindo em mais de 50% a capacidade de pastagem, além de proporcionar maior desenvolvimento de plantas daninhas. Os prejuízos causados pela atividade de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae), numa densidade de 4 colônias ha^{-1} foram calculados em 14% para plantações de *Eucalyptus* spp. e 14,5% para a produção de *Pinus* spp. (AMANTE, 1972). *A. sexdens rubropilosa* é popularmente conhecida como “saúva-limão” e encontra-se distribuída pelos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Goiás e Paraná (DELLA LUCIA et al., 1993).

Anjos et al. (1998) descreveram que o desfolhamento provocado pelas formigas-cortadeiras em ecossistemas tropicais provoca o consumo de 15% da produção florestal. Segundo Zanetti et al. (2003b), as formigas-cortadeiras são consideradas as principais pragas de reflorestamentos no Brasil, podendo reduzir a produção de madeira de *Eucalyptus* spp. em até 0,87% por ha a cada incremento unitário do número de ninhos dessas formigas.

Essas formigas, além de consumirem de 4 a 17% da produção de folhas de uma floresta como a Amazônica (ARAÚJO JR., 2004), criam clareiras de sub-bosque para a construção dos ninhos, aumentando a quantidade de luz que chega ao chão da floresta e modificando a composição de espécies e a estrutura das comunidades vegetais

(FARJI-BRENER; ILLES, 2000). As cortadeiras ocorrem durante o ano todo podendo não apresentar redução na sua população, além de atacarem plantas de todas as idades (DELLA LUCIA; ARAÚJO, 2000).

2.2 Formigas-cortadeiras e seu fungo simbiote *versus* fungos associados

Os membros da tribo Attini são cultivadores de fungo da família Agaricaceae e Pterulaceae (Basidiomycota: Agaricales), que lhe serve como principal suplemento alimentar (REYNOLDS; CURRIE, 2004). Elas fornecem folhas frescas e flores como substratos de suporte ao crescimento do cultivo e promovem o crescimento de seu fungo simbiote por meio da poda e do movimento de enzimas no jardim (BASS; CHERRET, 1996).

O jardim de fungo de formigas da tribo Attini é considerado uma comunidade microbiana, pois diversos microrganismos podem ser encontrados neste ambiente particular, além do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Basidiomycota: Agaricales) (RODRIGUES et al., 2008). Estudos taxonômicos revelaram a presença de duas novas espécies de leveduras, a *Cryptococcus haglerorum* (Basidiomycota: Tremellales) (MIDDELHOVEN et al., 2003) e *Sympodiomyces attinorum* (Ascomycota: Saccharomycetales) (CARREIRO et al., 2004), sendo descritas em associação com *A. sexdens rubropilosa*. No entanto, sua relação com o fungo simbiote e com as formigas cultivadoras ainda é pouco conhecida.

Além disso, existem fungos parasitas do gênero *Escovopsis* Muchovej & Della Lucia (Ascomycota: Hypocreales) que são conhecidos em jardins de fungo de formigas Attini (REYNOLDS; CURRIE, 2004). Fungos deste gênero parecem ser obrigatoriamente especializados na simbiose com microrganismos de formigas da tribo Attini; tendo sido encontrados naturalmente somente em jardins de fungo de formigas e associados às câmaras de lixo (BOT et al., 2001).

Com relação aos mecanismos de patogenicidade, Currie (2001b) especula que *Escovopsis* sp. pode competir com o fungo simbiote pelo substrato presente nos ninhos, embora, acredita-se que o parasita retire seus nutrientes do próprio fungo, atuando como um micoparasita. Pode devastar ninhos que estão sem o controle das operárias em um

período de 12 a 24 horas e em alguns casos, ninhos que ainda estejam sob influência das operárias (CURRIE et al., 1999).

Outro tipo de fungo que está associado à relação de formigas-cortadeiras e seu simbiote são os antagonistas não especializados como *Syncephalastrum racemosum* (Cohn) Schröter (Zygomycota: Mucorales), *Cunninghamella elegans* Lendn. (Zygomycota: Mucorales) e *Trichoderma harzianum* Rifai (Ascomycota: Hypocreales) que são saprófitas comumente encontrados em laboratório ou no campo em ninhos de formigas Attini, sendo importados pelas formigas com o material vegetal recolhido ou adquiridos a partir do solo (RODRIGUES et al., 2008) e que podem inibir o crescimento do fungo simbiote quando estudados em testes *in vitro* (SILVA et al., 2006).

2.3 Controle químico de formigas-cortadeiras

Considerados insetos formidáveis pela eficiência no corte e transporte de folhas, as formigas-cortadeiras possuem várias características biológicas e comportamentais que lhes conferem tal posição. Contudo, tais características constituem uma barreira para a utilização de novas moléculas e técnicas de controle dessas pragas (MARINHO et al., 2006).

Entretanto, o controle químico dessas formigas tem sido efetivamente utilizado desde a década de 50 do século passado, quando os inseticidas foram sintetizados, variando na formulação e modo de aplicação, sendo o único com tecnologia disponível para utilização prática no controle de formigas-cortadeiras, principalmente com o uso de iscas tóxicas (BOARETTO; FORTI, 1997). Outros métodos de controle vêm sendo testados para formigas-cortadeiras (biológico, por exemplo), no entanto, o controle químico é o único com tecnologia disponível para uso em grande escala, destacando-se a termonebulização e as iscas tóxicas como as técnicas mais eficientes (MOREIRA et al., 2004).

Por outro lado, pesquisas relacionadas às condições ambientais como luz e temperatura já foram exploradas por alguns autores para explicar respostas comportamentais e formas de controle alternativo (PARRA et al., 1974; ROCES; KLEINEIDAM, 2000), bem como o uso de plantas com propriedades inseticidas, podendo

provocar efeitos diretos sobre as operárias de formigas-cortadeiras ou indiretos sobre o crescimento de seu fungo simbiote (BUENO; BUENO, 2011).

Outro campo bem explorado é o uso de agentes entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Ascomycota: Hypocreales) e *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) para o controle de formigas (ALVES; SOSA GOMEZ, 1983; JACCOUD et al., 1999; LOUREIRO; MONTEIRO, 2005) ou combinados com inseticidas (SANTOS et al., 2007). Porém, apesar dos esforços envolvendo o conhecimento de áreas relacionadas a outros métodos, o controle químico de formigas-cortadeiras ainda se constitui no método mais amplamente utilizado, por ser considerado o mais eficiente dentre os métodos de controle disponíveis (OLIVEIRA et al., 2011).

2.4 Características desejadas de princípios ativos

De modo geral, somente os ingredientes ativos que apresentam ação retardada são eficientes para formigas-cortadeiras quando formulados em iscas tóxicas (FORTI et al., 1998), pois é necessário que o inseticida preencha algumas exigências para que seja formulado em iscas tóxicas, tais como: (a) ser letal em baixa concentração e ao mesmo tempo não matar as formigas rapidamente quando em alta concentração; (b) ser um inseticida de ingestão, com ação lenta; (c) não ser repelente; (d) ser facilmente difundido por trofalaxia para a maioria das operárias e, (e) ser degradado rapidamente, com baixa toxicidade para os vertebrados e não causar muitos prejuízos ao ambiente.

Durante muitos anos, o dodecacloro, um ingrediente ativo organoclorado utilizado no Brasil continha todas essas características associadas, porém, por ser persistente no solo e ser bioacumulativo foi proibido em 1992 (BOARETTO; FORTI, 1997). Sua proibição foi dada com a descoberta de outro princípio ativo substituto, a sulfluramida.

A maioria das iscas tóxicas presentes no mercado é à base de sulfluramida (concentração de 0,3%), devido a sua eficiência de 90 a 100% de mortalidade no controle de várias espécies de formigas-cortadeiras como *Atta laevigata* (F. Smith, 1858)

(Hymenoptera: Formicidae) (ZANUNCIO et al., 1992), *Acromyrmex subterraneus molestans* Santschi, 1925 (Hymenoptera: Formicidae) (ZANETTI et al., 2003a) e *A. sexdens rubropilosa* (ZANETTI et al., 2003c).

Apesar da descoberta da sulfluramida, a busca e o desenvolvimento de novos ingredientes ativos continuam, pois este é considerado um ingrediente ativo bioacumulativo e sua restrição no controle desta praga está em discussão. Em virtude disso, muitas pesquisas têm dado ênfase na busca de novos ingredientes ativos como, por exemplo, o diflubenzuron e fenoxicarbe, entre outros (JACOB, 2002). De acordo com Zanuncio et al. (1993), existem muitos produtos capazes de matar as formigas, mas poucos têm ação retardada nas concentrações adequadas, sendo portanto, ineficazes para serem usados como ingredientes ativos de iscas formicidas.

2.5 Ingredientes ativos

Grupos de pesquisa em mirmecologia como, por exemplo, o Laboratório de Insetos Sociais-Praga da Faculdade de Ciências Agronômicas, da Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, vêm realizando diversos ensaios de laboratório e de campo na busca por ingredientes ativos promissores para serem empregados em iscas formicidas. Com base nos resultados preliminares destes ensaios de laboratório é que foram selecionados os ingredientes ativos utilizados nos experimentos desta tese.

2.5.1 Sulfluramida

Pertence ao grupo químico sulfonamida fluoralfática, denominado de sulfluramida, mas com o nome químico IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry): N-etilperfluor-octano-1-sulfonamida, primeiramente estudado no combate das formigas lava-pés *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) nos EUA (FORTI et al., 1998).

Esse composto, quando presente no organismo, é transformado no metabólito perfluorooctano sulfonamida que bloqueia o fluxo de elétrons da cadeia respiratória,

nas mitocôndrias, interrompendo a síntese de adenosina trifosfato (representado pela sigla ATP na língua inglesa). Desse modo, as operárias intoxicadas apresentam movimentos lentos e agressividade diminuída. Além disso, a contaminação por sulfluramida é dada pela ingestão com a contribuição da trofalaxia e possivelmente durante o *grooming* (BRUGGER et al., 2008) entre as operárias e após quatro dias de aplicação, os ninhos não apresentam corte de folhas, muitas operárias estão mortas e a cultura de fungo torna-se desorganizada. Além disso, é menos persistente do que o dodecacloro (JACOB, 2002).

2.5.2 Fipronil

Além da sulfluramida, a maior descoberta de efetividade de ingrediente ativo contra formigas-cortadeiras foi o fipronil (GROSMAN et al., 2002), cujo nome químico IUPAC é [(RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro-a,a,a-trifluoro-p-tolil)-4-trifluorometilsulfinilpirazole-3-carbonitrila]. Pertence ao grupo químico fenil pirazol, sendo comercializado como formicida e cupinicida.

É um inseticida neurotóxico que bloqueia a transmissão de sinais das células nervosas pela inibição do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (representado pela sigla GABA na língua inglesa) (COLE et al., 1993). Iscas contendo este ingrediente ativo são produzidas em pequena escala comercial e são de baixa eficiência contra algumas espécies de formigas-cortadeiras como *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera: Formicidae) (FORTI et al., 2003).

2.5.3 Indoxacarbe

O indoxacarbe é um inseticida pertencente ao grupo químico oxadiazina, com o nome químico IUPAC: metil (S)-N-[7-cloro-2,3,4a,5-tetrahidro-4a-(metoxycarbonil) indeno[1,2-e][1,3,4]oxadiazina-2-ilcarbonil]-4'-(trifluorometoxi) carbanilato. Uma característica fundamental deste composto é sua forma de bioativação, em que bloqueia os canais de sódio pela mudança de voltagem a partir da produção de um metabólito chamado de N-decarbometoxilato. É um inseticida altamente ativo, de amplo espectro quando

administrado diretamente por via tópica ou via oral para insetos-praga, principalmente em Lepidoptera, mas também em Hemiptera e Coleoptera (WING et al., 2000).

Indoxacarbe representa o primeiro inseticida comercializado que atua no bloqueio de canais de sódio no axônio da célula neural, um mecanismo de ação primeiramente identificado em pirazolina (outro composto químico bloqueador de canais de sódio). A descoberta de indoxacarbe foi devido ao esforço em aperfeiçoar o uso de pirazolina como inseticida eficiente e seguro para organismos não-alvos e ao ambiente (McCANN et al., 2001).

2.5.4 Imidaclopride

Importante inseticida pertencente ao grupo químico neonicotinoide, com o nome químico IUPAC: 1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidina-2-ilideneamina, possuindo diversos modos de ação (sistêmico, contato e ingestão). Dentre os neonicotinoides com potencial de uso na agricultura estão o imidaclopride, acetamipride e tiametoxam (ISHAAYA et al., 2007).

Os neonicotinoides atuam especificamente em pragas sugadoras e têm efeito leve sobre os inimigos naturais (predadores e parasitoides), ajustando-se aos programas de Manejo Integrado de Pragas (ISHAAYA et al., 2007). Nos insetos, agem como agonistas de receptores nicotínicos da acetilcolina (representado pela sigla nAChR na língua inglesa) na sinapse da célula neural, resultando em excitação e paralisia seguida de morte. É reportado como um dos inseticidas sistêmicos com maior potencial e de largo espectro (insetos sugadores) no controle de pragas (ISHAAYA et al., 2007; ELBERT et al., 2008).

2.5.5 Diafenthiuron

É um inseticida e acaricida que pertence ao grupo químico tiourea, com o nome químico IUPAC: 1-tert-butil-3-(2,6-di-isopropil-4-fenoxifenil) tiourea. Diafenthiuron é relatado como um pró-inseticida que pode ser convertido para o correspondente carbodiimida (potente inseticida) por um processo de fotodegradação, principalmente em

condições de campo, tendo sua ação comprovada contra algumas espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Blattodea (RUDER; KAYSER, 1993).

Supõe-se que o modo de ação de diafentiuron quando convertido em carbodiimida envolva a inibição da síntese de ATP (a porção de oligomicina que é sensível) ao nível de mitocôndria das células (PETROSKE; CASIDA, 1995). Essa inibição da enzima se torna irreversível e ocorre uma contínua diminuição na taxa de consumo por oxigênio, reduzindo a atividade de locomoção de insetos. Primeiramente, pela inibição do metabolismo de energia para o sistema nervoso e digestório devido a inibição da ATPase mitocondrial e, conseqüentemente, pela paralisia muscular (RUDER; KAYSER, 1993).

3 CAPÍTULOS

Capítulo I

PREVALÊNCIA DO FUNGO *Leucoagaricus gongylophorus* (BASIDIOMYCOTA: AGARICALES) E CONTAMINAÇÃO DE OPERÁRIAS APÓS APLICAÇÃO DE FIPRONIL E SULFLURAMIDA EM *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Resumo

Jardins de fungos de formigas-cortadeiras (Formicidae: Attini) podem ser parasitados por outros fungos de crescimento rápido, principalmente quando se encontram em estado de estresse. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de ingredientes ativos de formicidas comerciais sobre a micota de *A. sexdens rubropilosa*. Foram utilizadas colônias de laboratório com 750 mL de fungo para aplicação de formicidas. Os tratamentos foram divididos em dois grupos de acordo com o tempo de ação tóxica: i) controle e fipronil [0,003%] (ação rápida); ii) controle e sulfluramida [0,3%] (ação retardada) aplicados na forma de isca granulada. Para cada grupo de tratamento avaliado foram retiradas 250 operárias das colônias para dissecação devido ao uso de corante lipossolúvel e 25 fragmentos de fungo que foram inoculados em meio BDA, sendo o fungo derivado do isolamento identificado por técnica molecular. Houve contaminação de diferentes castas de operárias, mas não foi observada a prevalência de nenhuma espécie de fungo filamentoso relatado na literatura como parasita de *L. gongylophorus* em ambos os grupos de ação tóxica, demonstrando que nem sempre ocorre sinergismo de IA formicida e fungos parasitas do simbionte de *A. sexdens rubropilosa* e que provavelmente a ocorrência de fungos parasitas está relacionada com a micota do ambiente de cada colônia.

Palavras-chave: jardim de fungo, formigas-cortadeiras, ingrediente ativo, parasitismo.

PREVALENCE OF THE FUNGI *Leucoagaricus gongylophorus* (BASIDIOMYCOTA: AGARICALES) AND CONTAMINATION OF WORKER AFTER APPLICATION OF FIPRONIL AND SULFLURAMID IN *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Summary

Fungus gardens of leaf-cutting ants (Formicidae: Attini) can be parasitized by other fast-growing fungi, especially when they are in a state of stress. The aim of this study was to evaluate the effect of active ingredients of formicides commercials on the ant fungal mycota of *A. sexdens rubropilosa*. We used laboratory colonies with 750 mL of fungus for application of fomicidal. The treatments were divided into two groups according to the time of toxic action: i) control and fipronil [0.003%] (fast action), ii) control and sulfluramid [0.3%] (delayed action) applied as granulated bait. For each treatment group, 250 workers of the colonies were removed for dissection due to the use of fat-soluble dye and 25 fragments of fungus were inoculated on PDA and the isolate obtained were identified by molecular technique. There was contamination of different castes of workers, but was not observed prevalence of any species of filamentous fungi reported in the literature as a parasite of *L. gongylophorus* in both groups of toxic action, demonstrating that not always occurs synergism of formicidal active ingredient and parasites fungi of the symbiont of *A. sexdens rubropilosa* and probably the occurrence of parasitic fungal mycota is related to the environment of each colony.

Keywords: garden of fungi, leaf-cutting ants, active ingredient, parasitism.

1.1 Introdução

A sobrevivência da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Formicidae: Myrmicinae: Attini) está associada ao sucesso no cultivo de seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Basidiomycota: Agaricales), o qual lhe serve como principal suplemento alimentar durante milhões de anos de coevolução, sendo necessário o corte de partes de plantas para ser incorporado como substrato no seu jardim (MUELLER, 2002).

Porém, além da estreita relação desta espécie com seu fungo simbiote, também pode ocorrer uma associação negativa (não simbiote) com outros fungos como, por exemplo, *Escovopsis* (Ascomycota) que é um parasita especializado do fungo *L. gongylophorus* com origem conhecida nos jardins de Attini, podendo ser horizontalmente transmitido entre as colônias (CURRIE et al., 1999) ou por espécies de invertebrados que vivem em associação com o cultivo do fungo de formigas e que ocasionalmente se movem entre as colônias transportando-o (CURRIE, 2001a). A comunidade microbiana dentro das colônias é considerada bastante extensa, pois vem sendo reportada por Rodrigues et al. (2008) e Mendes et al. (2012), os quais relatam a existência de associações com diferentes espécies de fungos.

Entretanto, alguns estudos têm relatado o comportamento da comunidade microbiana após o uso de ingredientes ativos (IA's) em iscas formicidas (RODRIGUES, 2004; CARLOS et al., 2011), principalmente *Escovopsis* spp., *Syncephalastrum racemosum* (Cohn) Schröter (Zygomycota), *Trichoderma harzianum* Rifai

(Ascomycota) e *Fusarium oxysporum* Schlechtendal (Ascomycota) fungos que prevaleceram após serem tratados com iscas tóxicas, sendo o rápido crescimento de fungos filamentosos devido, provavelmente, ao estresse causado na associação entre formiga e fungo simbiote (RODRIGUES et al., 2005).

As iscas contendo ingrediente ativo com ação rápida, dependendo da idade da colônia, podem não matá-la, mas afetá-la drasticamente com a morte de operárias. Com essas infecções persistentes, o fungo parasita ocasiona um impacto significativo na sanidade e sobrevivência dos ninhos, diminuindo a taxa de crescimento, esta traduzida na redução da biomassa tanto de formigas como do fungo simbiote (CURRIE, 2001b).

Contudo, o uso de iscas que promovam sinergismo com fungos parasitas pode provocar um impacto inicial muito grande na colônia, pois além da grande mortalidade de operárias e desorganização da divisão de trabalho, pode ainda, favorecer o estabelecimento do fungo parasita dentro do ninho, potencializando o controle de formigas-cortadeiras. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de ingredientes ativos de formicidas comerciais, de acordo com seu tempo de ação tóxica sobre a micota de *A. sexdens rubropilosa*.

1.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Insetos Sociais-Praga, localizado na FCA/UNESP, Botucatu, SP. Foram utilizadas colônias de *A. sexdens rubropilosa* com um ano de criação em ambiente controlado ($24^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar de $70\% \pm 5$), com fornecimento de substrato vegetal das espécies *Ligustrum* sp. (Oleaceae) e *Acalypha* sp. (Euphorbiaceae). As colônias foram mantidas em recipientes plásticos com volume de 1L (câmara do fungo simbiote), em cuja base havia uma camada de 1,5 cm de gesso (manutenção da umidade), além das câmaras de forrageamento e de lixo (cada um com 390 mL de capacidade), sendo periodicamente umedecido com água destilada.

Os tratamentos foram divididos em dois grupos, conforme o tempo de toxicidade dos IA's testados para *A. sexdens rubropilosa*, baseados em estudos realizados por Nagamoto et al. (2004) e Nagamoto et al. (2007), onde ocorreu 90% de mortalidade de

operárias. Assim, um grupo foi denominado de ação rápida (mortalidade total em até dois dias), representado pelos tratamentos: 1- controle e 2- fipronil [0,003%]. O outro grupo foi chamado de ação retardada (mortalidade total em até sete dias), com os tratamentos: 1- controle e 2- sulfluramida [0,3%]. Todos foram aplicados na forma de isca granulada.

As iscas foram compostas dos seguintes ingredientes: pó de polpa cítrica, óleo de soja, carboxi-metil-celulose, ingrediente ativo, acetona e água destilada. Além destes componentes, foi adicionado o corante lipossolúvel Sudan Black (Sigma-Aldrich) devido à solubilidade dos IA's testados que pode ser direcionada para a glândula pós-faríngea (GPF) (FORTI et al., 2012), o que possibilitou a sua observação após a dissecação das operárias em estereoscópio (ANDRADE et al., 2002), e consequentemente, a dispersão do IA entre as operárias das colônias tratadas. A proporção de castas de operárias dissecadas seguiu a metodologia de Wilson (1980). Foram aplicadas 0,1g de isca granulada para cada 100 mL de volume de fungo das colônias.

Após aguardar o efeito tóxico de cada grupo de tratamento (rápido e retardado), iniciou-se a coleta do material fúngico das colônias para inoculação. Para cada grupo avaliado foram retiradas ao acaso 500 operárias, sendo então armazenadas em baixa temperatura para posterior dissecação. Em seguida, foram extraídos com pinça esterilizada 25 fragmentos de aproximadamente 30 mm³ de fungo de forma aleatória (parte jovem, mediana e antiga da esponja) de cinco diferentes colônias (repetições dos tratamentos), sendo a mesma descartada logo em seguida. Estes fragmentos foram inoculados em placas de Petri esterilizadas (90 mm x 15 mm), contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar) com adição de antibiótico (Estreptomicina e Penicilina G) para repicagem e posterior identificação do fungo, sendo mantidas a 25° C durante o período de crescimento.

As placas foram observadas diariamente e as repicagens de fungos realizadas em dois momentos, de acordo com a necessidade: o primeiro quando o crescimento fúngico apresentava 15 mm de expansão máxima radial em relação ao ponto central de inoculação e; o segundo, quando atingia o 30º dia de inoculação na placa de Petri. Após esta etapa foram montadas lâminas para identificação microscópica dos fungos para triagem de fungos simbiotes e associados. Posteriormente, os fungos foram identificados utilizando a técnica do código de barras de DNA (DNA *barcoding*). A extração do DNA total dos isolados foi feita a partir do micélio utilizando-se o método CTAB (hexadecyltrimethylammonium

bromide) proposto por Doyle e Doyle (1990). Cerca de 100 a 150 mg de micélio foram macerados em nitrogênio líquido e transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo 650 μ L de solução tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaCl; 2% CTAB; 1% PVP; 0,2% Mercaptoetanol; 50 g mL⁻¹ Proteinase K). Os tubos foram misturados por inversão e incubados a 55° C por 1 h, agitando-se a cada 15 min. Após as amostras serem resfriadas à temperatura ambiente, um volume 650 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi adicionado.

A mistura foi agitada manualmente por 2 min e em seguida centrifugada a 12.000 G por 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, e um volume igual de isopropanol gelado (cerca de 600 μ L) foi acrescentado. A solução foi incubada a -20° C por 4 h. Posteriormente procedeu-se a centrifugação a 12.000 G por 5 min, descartando-se em seguida a fase líquida. O DNA foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% e ressuspenso em 50 mL de TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA), contendo 10 g mL⁻¹ RNase.

Para amplificação por PCR, foi usado um volume final de 50 μ L, contendo: 60 ng de DNA genômico, 10X enzima tampão, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 1U Taq DNA polimerase, 30 pmol para cada primer. Condições para amplificação de ciclos térmicos foram realizadas em um termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.) com 35 ciclos de 94° C por 1 min, 60° C por 1 min e 72° C por 1 min e a extensão final de 72° C por 10 min. O primer universal ITS5 e ITS4 (WHITE et al., 1990) (região ITS1-5,8S-ITS2) foi utilizado e o sequenciamento Sanger desenvolvido pela MacroGen®. O acesso inicial de identificação da sequência foi desenvolvido via BLASTN pesquisando em BOLD e NCBI.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 2 grupos de tratamentos (controle e IA para cada grupo) e 125 repetições (25 inoculações X 5 colônias). A análise estatística de prevalência de fungos foi realizada utilizando o teste de Qui-quadrado ($P < 0,05$), com o uso da proporção (frequência absoluta) de fungo simbiote e de fungos associados de *A. sexdens rubropilosa* pelo programa BioEstat 5.0 e gráficos pelo SigmaPlot 10.0. Também foi realizada uma análise em fatorial (2x3) com a variável porcentagem de GPF corada, onde o primeiro fator foram os IA's (fipronil e sulfluramida) e o segundo as castas de operárias (jardineiras, generalistas e forrageiras),

fazendo-se comparações de médias com o teste de Tukey ($P < 0,05$), após verificar distribuição normal dos dados pelo programa Sisvar 5.1.

Uma terceira análise foi realizada para estimar os valores da porcentagem de GPF corada, conforme o IA aplicado e a casta de operária, aplicando-se regressão logística múltipla pelo programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007). Nesta análise foi possível avaliar duas variáveis independentes: largura da cabeça de operárias (mm) de acordo com Wilson (1980) (variável contínua) e a presença (assume-se valor 1) ou ausência (assume-se valor 0) de GPF corada, de acordo com a dissecação de operárias (variável binária), resultando em uma resposta dependente y que é a porcentagem de GPF corada de acordo com as condições das variáveis da equação para avaliar a dispersão do IA entre as operárias.

1.3 Resultados

As frequências absolutas resultantes da identificação dos fungos (simbionte e associado) em colônias de *A. sexdens rubropilosa*, após aplicação de iscas contendo ingrediente ativo de ação rápida e retardada são apresentadas na Figura 1. No grupo de ação rápida, quando se compara o tratamento controle com o tratamento fipronil, tanto a proporção de fungo simbionte ($\chi^2=0,180$; $P=0,6714$), quanto a de fungos associados ($\chi^2=0,720$; $P=0,3961$) não foi significativa.

Porém, quando se fez comparações das proporções (simbionte e associado) dentro destes tratamentos, nota-se diferença significativa, sendo o controle com valor de $\chi^2=38,088$ ($P=0,0001$) e fipronil com valor de $\chi^2=52,488$ ($P=0,0001$). Esta diferença foi devido à alta frequência que a proporção do fungo simbionte obteve em ambos os tratamentos deste grupo (Figura 1).

Na análise do grupo de ação retardada o resultado pode ser considerado semelhante ao de ação rápida, pois ao se comparar a proporção de fungo simbionte é possível verificar diferença não significativa entre o tratamento controle e o tratamento sulfluramida ($\chi^2=0,006$; $P=0,9372$), ocorrendo o mesmo com a proporção de fungos associados ($\chi^2=0,011$; $P=0,9156$). Também ocorre diferença significativa dentro de

cada tratamento quando se comparam as proporções de fungos devido às altas frequências do fungo simbiote (Figura 1), sendo o controle com valor de $\chi^2=10,952$ ($P=0,0009$) e sulfluramida com valor de $\chi^2=9,800$ ($P=0,0017$).

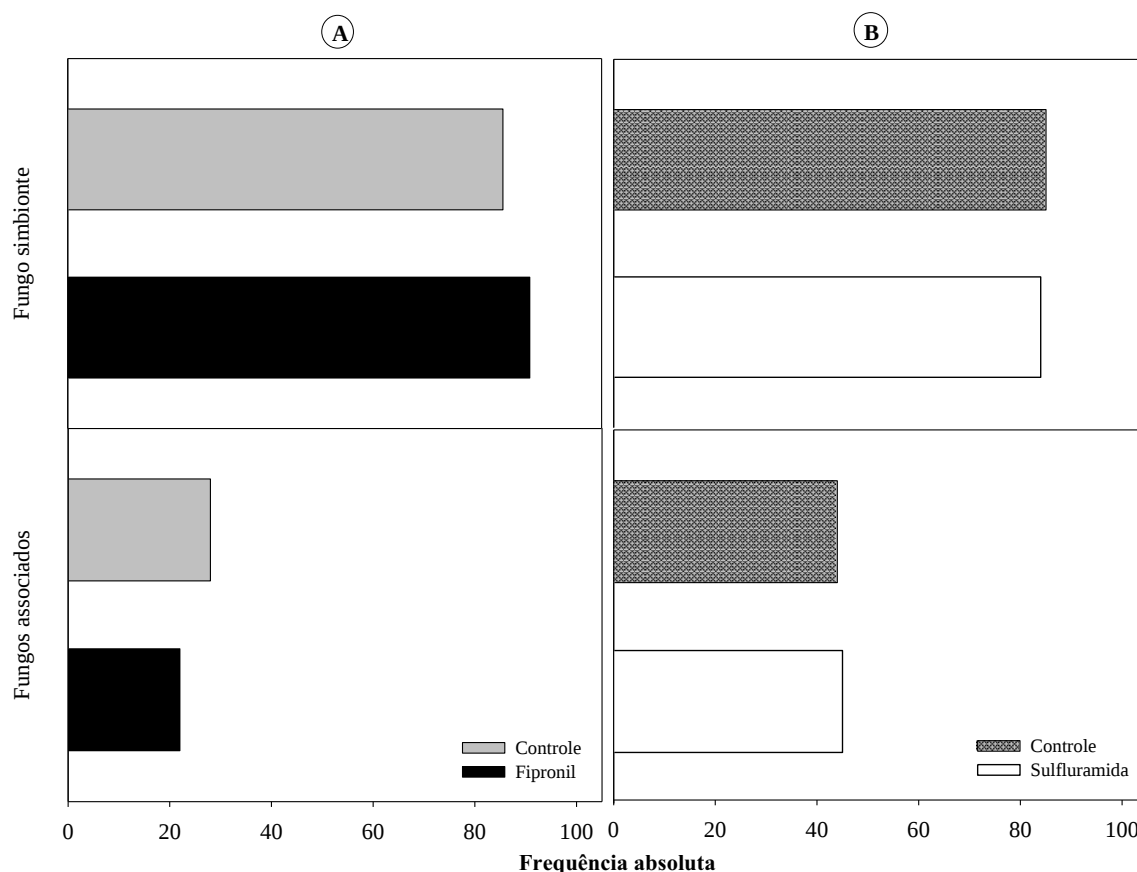


Figura 1. Frequência absoluta de fungos após aplicação de ingredientes ativos em colônias de *Atta sexdens rubropilosa*. A: grupo de ação rápida; B: grupo de ação retardada.

Entretanto, quando se faz uma análise apenas dos tratamentos com IA (fipronil e sulfluramida), verifica-se diferença significativa somente na proporção de fungos associados entre estes ($\chi^2=7,896$; $P=0,0050$), pois a quantidade de fungos encontrada nas colônias após aplicar iscas contendo o IA sulfluramida foi duas vezes maior do que o valor obtido quando se aplicou o IA fipronil (Figura 1). Isto pode ter ocorrido devido ao tempo de ação tóxica do IA e do tempo para extração do fragmento do jardim de fungo.

As porcentagens da GPF corada em função dos IA's e castas de operárias constam na Tabela 1. Verificou-se que o resultado do primeiro fator (IA's) foi não

significativo ($F=0,312$; $P=0,5818$). Os IA's testados coram a GPF de operárias de *A. sexdens rubropilosa* de forma semelhante. Por outro lado, as castas de operárias apresentaram médias da GPF corada estatisticamente diferentes ($F=9,487$; $P=0,0009$), demonstrando que as forrageiras foram menos contaminadas que as jardineiras, estando a casta das generalistas em posição intermediária. Na mesma análise não houve diferença significativa quando a causa de variação foi a interação entre IA e casta de operária ($F=1,430$; $P=0,2591$), indicando que as castas podem ficar com a GPF corada com a aplicação de ambos IA's.

Tabela 1. Avaliação da porcentagem de glândula pós-faríngea (GPF) corada de acordo com o ingrediente ativo e casta de operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

Ingrediente ativo	GPF corada (%) (média ± EP)^{ns}
Sulfluramida	51,46 ± 6,62
Fipronil	47,53 ± 6,10
Casta	GPF corada (%) (média ± EP)¹
Jardineiras	62,8 ± 5,25 a
Generalistas	57,7 ± 6,88 b
Forrageiras	28,0 ± 6,10 c
CV(%)	38,98
Média Geral	49,50

^{ns}Não significativo pelo teste exato de Fisher ($P<0,05$). EP: erro padrão.

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Com estes resultados, fica evidente que as operárias se contaminaram com ambos os IA's. Entretanto, após a dissecação das mesmas é possível realizar uma estimativa da GPF corada ou não corada, aplicando-se uma regressão logística múltipla. Apesar de depender de outros fatores, como a atratividade de iscas e a capacidade do corante ser absorvido pela GPF. Esta estimativa torna-se muito importante, pois permite conhecer a dispersão do inseticida entre as operárias e assim, relacionar a contaminação com a GPF

corada, além de suas consequências para a sanidade do jardim de fungo de *A. sexdens rubropilosa*.

Na Tabela 2 são apresentadas as porcentagens estimadas da GPF corada, após a aplicação de fipronil e sulfuramida. O tratamento controle foi fundamental na estimativa, pois permitiu criar uma variável binária para cada grupo de ação tóxica testado neste trabalho. As regressões foram estimadas para cada grupo de ação tóxica e a chance da GPF estar corada e com IA após a aplicação das iscas foi 2,2 para fipronil e 1,41 vezes para sulfluramida. Assim, as equações de regressão foram definidas da seguinte forma:

- a) ação rápida: $\text{Logit } y = -0,9447 + (0,4730x_1) + (0,7897x_2)$.
- b) ação retardada: $\text{Logit } y = -0,6294 + (0,3561x_1) + (0,3444x_2)$.

Sendo:

y=porcentagem de GPF corada;

x_1 =largura da cabeça de operárias (WILSON, 1980);

x_2 =presença (valor 1) ou ausência (valor 0).

Com base nestas equações foi possível estimar a porcentagem de GPF corada (Tabela 2), permitindo prever qual casta de operária tem maior probabilidade de se contaminar. Em geral, as porcentagens ficaram entre 40 a 70% de GPF corada, sendo o controle com valores mais baixos em ambos os grupos testados devido à ausência dos IA lipossolúveis estudados como componente das iscas aplicadas.

Tabela 2. Porcentagem estimada da glândula pós-faríngea (GPF) corada de operárias, empregando-se regressão logística, após aplicação de iscas tóxicas em colônias de *Atta sexdens rubropilosa*.

Ação tóxica	Tratamento	Largura de cabeça (mm) ¹	GPF (%)
Rápida	Controle	1,0	38,42
		1,4	42,98
		2,2	52,40
	Fipronil	1,0	57,88
		1,4	62,41
		2,2	70,80
Retardada	Controle	1,0	43,21
		1,4	46,76
		2,2	53,84
	Sulfluramida	1,0	51,78
		1,4	55,32
		2,2	62,21

¹Valores de largura de cabeça definidos de acordo com Wilson (1980).

Mesmo comprovando a contaminação das operárias utilizadas neste trabalho pelos IA`s aplicados, não foi observado a prevalência de nenhuma espécie de fungo filamentoso que tenha relato na literatura de parasitismo em *L. gongylophorus*, pois na identificação por uso de técnica molecular dos fungos inoculados não foi constatada a ocorrência destas espécies em nenhum grupo estudado em todas as colônias tratadas (Tabela 3).

Tabela 3. Fungos associados isolados de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* após aplicação de ingredientes ativos.

Espécies de fungos	Similaridade (%)	Acesso ao GenBank	Rápido				Retardado		Total
			Controle	Fipronil	Controle	Sulfluramida			
<i>Cyphomyrmex muelleri</i>	100	JQ617621.1	0	0	0	1			1
<i>Fusarium solari</i>	100	JN235224.1	1	0	0	0			1
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	100	JQ425356.1	0	2	0	1			3
<i>Preussia polymorpha</i>	98	JX076984.1	1	0	0	1			2
<i>Penicillium citrinum</i>	100	HM486421.1	1	0	0	1			2
<i>Trichosporon chiarellii</i>	96	GQ338074.1	0	1	0	1			2
Total			3	3	0	5			11

1.4 Discussão

A ocorrência de *L. gongylophorus* e de fungos associados em ambos os grupos de ação tóxica foram semelhantes, demonstrando que diferentes tempos de ação de IA não interferiram diretamente na composição da comunidade de fungos em *A. sexdens rubropilosa* nem tão pouco ocorreu sinergismo com fungos parasitas de seu simbiote (Figura 1). Entretanto, a presença de uma única espécie destes fungos parasitas de crescimento rápido pode ser suficiente para contaminar todo o jardim de fungo (RODRIGUES et al., 2005, 2008), pois foi possível observar esta situação no experimento prévio deste trabalho, onde identificou-se o crescimento de *Escovopsis* sp. em algumas placas de Petri com BDA.

Apesar de não ter sido verificada esta situação neste trabalho, vale lembrar que já ocorreram observações de outros autores sobre a dominância de *Escovopsis* sp. em colônias de formigas-cortadeiras (CURRIE et al., 1999; NAGAMOTO et al., 2003; REYNOLDS; CURRIE, 2004). Currie et al. (2003) sugerem que esta espécie possui coevolução especializada com ninhos de formigas-cortadeiras e seu simbiote.

Contudo, se a ocorrência deste fungo parasita fosse considerada como certa após a aplicação de sulfluramida (estresse químico), poderia haver alta probabilidade de ocorrer neste experimento, pois foram reproduzidas as mesmas condições de experimentação (mesma origem, idade e sistema de criação) em relação ao experimento de prévia, mas com maior número de colônias. Todavia, várias espécies de fungos filamentosos foram identificadas, exceto *Escovopsis* sp..

Rodrigues et al. (2008) ao escavarem colônias de *Acromyrmex* spp. adultas de campo relataram que outras espécies de fungos também podem surgir com maior frequência do que *Escovopsis* sp. e que podem causar doenças e parasitismo no fungo simbiote de formigas-cortadeiras. Carlos et al. (2011), por exemplo, identificaram maior prevalência do gênero *Penicillium* nos tratamentos controle (carbonato de cálcio) e IA (sulfluramida) em colônias de *A. sexdens rubropilosa* em laboratório.

Desta forma, acredita-se que cada colônia possui uma comunidade microbiana específica de acordo com seu histórico de vida e com o ambiente que habitam (por exemplo, campo e laboratório), mas que se encontram sob controle. Esta sugestão também foi mencionada por Nagamoto (2003) e assemelha-se com a proposta de Rodrigues et al. (2005),

cujos autores verificaram que muitos fungos filamentosos podem co-existir em estado dormente dentro de ninhos de *A. sexdens rubropilosa* e que alguns deles parecem estar firmemente associados com este ambiente, mas que nem sempre são parasitas, podendo se alimentarem até do substrato vegetal da colônia (fungos fitopatogênicos).

Assim, se dentro desta comunidade existir a presença de fungos parasitas de *L. gongylophorus*, provavelmente haverá um sinergismo com o IA aplicado, eliminando a possibilidade de recomposição da sanidade da cultura do fungo e, com isto, diminuir a chance de sobrevivência da colônia, apesar da contribuição do IA quando este causa alta mortalidade de diferentes castas de operárias, causando a desorganização da colônia.

De acordo com Forti et al. (1998), após 3 a 4 dias de aplicação de sulfluramida, as formigas cessam as atividades de forrageamento e observa-se alta mortalidade de operárias menores, apresentando sinais de desorganização. Desta forma, *Escovopsis* seria capaz de rapidamente sobrepor o jardim de fungo simbiote devido à ausência de cuidados das operárias (CURRIE et al., 1999).

Por outro lado, a prevalência do fungo simbiote nas placas inoculadas não significa sucesso da cultura de fungo, pois além de uma única espécie não simbiote parasítica ser capaz de reduzir as chances de sobrevivência, também existe o efeito inibitório dos cuidados das operárias com o jardim devido ao IA, reduzindo a probabilidade de a colônia sobreviver. Esta situação é semelhante à encontrada por Rodrigues et al. (2005), onde a presença de fungos filamentosos é muito comum após a redução de operárias; porém, estes autores encontraram algumas espécies parasitas do simbiote de *A. sexdens rubropilosa* em colônias de campo e de laboratório após aplicação de iscas com sulfluramida.

Ao usar o corante lipossolúvel como traçador é possível afirmar que uma significativa quantidade de indivíduos da colônia foi contaminada (GPF corada), pois o corante lipossolúvel é rapidamente absorvido por estas glândulas, possibilitando a contaminação (FORTI et al., 2012) (Tabela 2), por isso os IA's, que são lipossolúveis, apresentaram semelhanças na porcentagem de GPF corada.

No entanto, ao matar as operárias não se garante a prevalência destas espécies parasitas, então quais condições são necessárias para que isto ocorra? São possíveis de serem empregadas em iscas formicidas? É uma condição difícil de prever porque não se

tem a certeza da composição do consócio microbiano como, por exemplo, os resultados deste trabalho, onde foi aplicado um estado de estresse em colônias de laboratório e não houve prevalência de espécies de fungos parasitas, apesar de já ter sido relatada por outros autores (RODRIGUES et al., 2005, 2008; CARLOS et al., 2011). Além disso, não é possível prever se as iscas formicidas com o uso da formulação atual conseguirão obter esta característica, pois seu enfoque tem se destinado a eliminar diretamente as operárias (inseticida) e, como suposta consequência a prevalência de fungos filamentosos parasitas, reduzindo as chances de recomposição, matando a colônia.

Diferentemente dos relatos de Currie et al. (1999), que identificou o fungo *Escovopsis* sp. em *Atta* spp., não foi verificado a presença deste fungo, mesmo quando aplicado IA formicida nas colônias, mas corroboram com os trabalhos de RODRIGUES et al. (2005) e CARLOS et al. (2011), que encontraram prevalência de outros gêneros de fungos filamentosos em colônias de *A. sexdens rubropilosa* apesar das condições similares de estresse, indicando que as espécies de formigas-cortadeiras podem conter comunidades microbianas diferenciadas, contribuindo ou não com o controle após aplicação de iscas formicidas, mas sem considerá-la como ação sinérgica garantida.

Em virtude do exposto, o que poderia ser investigado por pesquisadores que buscam descobrir formas eficientes de controle de formigas-cortadeiras, seria o desenvolvimento de um IA que possua não somente a característica química desejável para se tornar um bom formicida (FORTI et al., 1998), mas também para se tornar um bom fungicida de fungos fitopatogênicos para provocar a morte de parte do simbionte ao ser incorporado pelas operárias no jardim de fungo. Assim, ao manipular a isca as formigas se contaminam (ação formicida) e ao incorporá-la em seu jardim, contaminam o fungo simbionte (ação fungicida), reduzindo as chances de sobrevivência, independente da presença ou ausência de fungos parasitas.

1.5 Conclusão

Os grupos de ação tóxica (IA rápido e retardado) apresentam o mesmo comportamento em relação às proporções de fungos, tanto para o simbionte como para os

associados. Houve prevalência do fungo *L. gongylophorus* entre os fungos isolados em placas após aplicação dos formicidas, demonstrando que nem sempre se pode afirmar que ocorre sinergismo de IA formicida e fungos parasitas do simbiote de *A. sexdens rubropilosa*, pois fungos como *Escovopsis* sp., que se apresentam como parasitas especializados e envolvidos na comunidade microbiana de formigas-cortadeiras, não foram identificados nas colônias tratadas, sugerindo que sua ocorrência está relacionada com a micota do ambiente de cada colônia individualmente.

Capítulo II

TOXICIDADE TÓPICA DE INGREDIENTES ATIVOS EM *Atta sexdens rubropilosa*
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Resumo

Formigas-cortadeiras são pragas quando prejudicam culturas cortando folhas, ramos e flores para oferecerem de substrato para seu fungo simbiote, provocando perdas significativas na produção. O principal ingrediente ativo para o controle dessas formigas é a sulfluramida, mas a restrição de seu uso já se encontra em discussão. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade tópica de novos ingredientes ativos (IA's) em operárias de *A. sexdens rubropilosa* na busca de promissores formicidas. Aplicaram-se quatro IA's por ação tópica em diferentes doses: sulfluramida (125, 250, 375 e 500 µg mL⁻¹), indoxacarbe (12,5, 25, 37,5 e 50 µg mL⁻¹), diafentiuron (137,5, 275, 412,5 e 550 µg mL⁻¹) e imidaclopride (30, 60, 90 e 120 µg mL⁻¹). Determinou-se a DL₅₀ e o TL₅₀ pelo método de probit, a eficiência de controle pela fórmula de Abbott (1925) e o modelo de regressão pela análise de variância. A DL₅₀ foi de 245,33 µg mL⁻¹ para sulfluramida, 7,29 µg mL⁻¹ para indoxacarbe, 42,53 µg mL⁻¹ para diafentiuron e 6,27 µg mL⁻¹ para imidaclopride. O TL₅₀ foi maior nas doses de sulfluramida seguido do IA diafentiuron. A eficiência de controle foi maior no IA imidaclopride e, todos os IA's apresentaram significância para o modelo linear de regressão. Os IA's sulfluramida e diafentiuron apresentaram ação tópica retardada, mostrando-se promissores formicidas de ação retardada para iscas tóxicas potencializando o controle pela ação de contato, além da ingestão. Já os IA's indoxacarbe e imidaclopride apresentaram ação tópica rápida, podendo ser empregados em formicidas que sejam formulados para atuarem especificamente por contato.

Palavras-chave: formigas-cortadeiras, contato, isca, controle.

TOPICAL TOXICITY OF ACTIVE INGREDIENTS IN *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Summary

Leaf-cutting ants are pests damage crops when cutting leaves, branches and flowers to provide a substrate for its symbiotic fungus, causing significant losses in production. The main active ingredient to control these ants is sulfluramid, but the restriction of its use is already in discussion. Therefore, we evaluated the topical toxicity of new active ingredients (AI's) in *A. sexdens rubropilosa* workers in search of promising formicidal. We applied four active ingredients for topical action in different doses: sulfluramid (125, 250, 375 and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), indoxacarb (12.5, 25, 37.5 and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), diafenthiuron (137, 5, 275, 412.5 and 550 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and imidacloprid (30, 60, 90 and 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$). We determined the LT_{50} and LD_{50} by the method of probit, the control efficiency using Abbott formula (1925) and regression model by analysis of variance. The LD_{50} was 245.33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to sulfluramid, 7.29 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to indoxacarb, 42.53 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for diafenthiuron and 6.27 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to imidacloprid. The LT_{50} was higher in sulfluramid doses followed by AI diafenthiuron. The control efficiency was higher in AI imidacloprid and all AI's showed significance for the linear regression model. The AI's sulfluramid and diafenthiuron showed topical delayed action, showing up promising delayed action formicidals for toxic baits enhancing control by contact action, beyond ingestion. Since the AI's indoxacarb and imidacloprid showed topical action fast and can be used in formicidal that are specifically formulated to work by contact.

Keywords: leaf-cutting ants, contact, bait, control.

2.1 Introdução

As formigas-cortadeiras são consideradas insetos-pragas de grande importância agrícola. Essas formigas utilizam diversas plantas para cultivar o fungo do qual se alimentam (MUELLER; GERARDO, 2002). Elas forrageiam flores e folhas frescas como substrato para o crescimento fúngico e transportam o material vegetal para câmaras de jardins de fungo, onde processam o material para incorporação nestes jardins (RODRIGUES et al., 2009).

O método químico representa a principal forma de controle destas formigas, principalmente pelo uso de iscas tóxicas com o ingrediente ativo (IA) sulfluramida. Este inseticida pertence ao grupo químico das sulfonas fluorolifáticas (N-etil perfluorooctano sulfonamida), primeiramente descoberto em estudo no controle das formigas lava-pés *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) (VANDER MEER et al., 1985). Atualmente, a maioria das iscas tóxicas presentes no mercado é à base de sulfluramida (concentração de 0,3%), devido a sua eficiência de 90 a 100% no controle de várias espécies de formigas-cortadeiras como *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae) (ZANUNCIO et al., 1992) e *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) (ZANETTI et al., 2003c).

Apesar da descoberta da sulfluramida como formicida, a busca e o desenvolvimento de novos IA's continuam, pois este inseticida é considerado bioacumulativo e sua restrição no controle de pragas já está em discussão devido sua degradação em sulfonato perfluorooctano (PFOS em inglês) (WANG et al., 2009). Em virtude disto, a busca de novos

IA's tóxicos para o controle de formigas-cortadeiras é intensa. Assim, alguns IA's como diafenthiuron, indoxacarbe e imidaclopride são inseticidas com ação tópica comprovada contra uma grande quantidade de insetos (WING et al., 2000; SUCHAIL et al., 2003; STANLEY et al., 2010), podendo se tornar promissores formicidas.

A velocidade de ação do inseticida (tempo letal) para provocar toxicidade se torna um fator determinante na eficiência de controle, pois substratos oriundos do forrageamento podem ser rejeitados por operárias devido à percepção de inseticidas (CAMARGO et al., 2003). Porém, a contaminação de operárias pode ocorrer durante o processo de manipulação desses substratos para o crescimento fúngico, o que requer muitas horas (ANDRADE et al., 2002), favorecendo o IA que atue por contato e/ou ingestão.

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a toxicidade tópica de IA's após sua aplicação em operárias de *A. sexdens rubropilosa*, determinando a dose média letal, o tempo médio letal e a eficiência de controle, com a perspectiva de identificar IA's como promissores formicidas.

2.2 Material e Métodos

Coletaram-se operárias de colônias com 5 anos de idade da criação do Laboratório de Insetos Sociais-Praga (Lisp), localizado na FCA/UNESP, Botucatu, SP. Estas colônias são criadas em recipientes plásticos com volume de 5L, com camada de 1,5 cm de gesso na base para manutenção da umidade e com o fornecimento de substrato vegetal das espécies *Ligustrum* sp. (Oleaceae) e *Acalypha* sp. (Euphorbiaceae). Foram selecionadas 680 operárias com largura de cabeça maior do que 2 mm em duas colônias de *A. sexdens rubropilosa* para serem utilizadas no experimento.

Foram aplicados quatro IA's nas operárias em quatro diferentes doses, totalizando 16 tratamentos, além do tratamento controle em que foi aplicado somente o solvente a base de acetona. Nos tratamentos formulados com IA também foi adicionado acetona para facilitar a solubilização e a penetração do mesmo no corpo dos insetos após a aplicação. Para a determinação das diferentes doses foi realizado um experimento prévio baseado em informações de aplicação destes IA's por ingestão, os quais já tinham sido

anteriormente realizados pelo Lisp. Os tratamentos foram assim delineados: sulfluramida nas doses de 125, 250, 375 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, indoxacarbe nas doses de 12,5, 25, 37,5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, diafentiuron nas doses de 137,5, 275, 412,5 e 550 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e imidaclopride nas doses de 30, 60, 90 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A aplicação dos tratamentos foi realizada por contato no tegumento do inseto (pronoto) com o uso de uma micropipeta de volume variável e com o uso de ponteiros descartáveis, sendo aplicado o volume de 0,5 μL por operária em cada tratamento. A aplicação no pronoto impede a possibilidade de ingestão do tratamento devido ao comportamento de limpeza em *A. sexdens rubropilosa*. Em seguida, cada operária foi acondicionada isoladamente em uma placa de Petri estéril (60 mm de diâmetro x 15 mm de altura) com fina camada de gesso umedecido de 3 mm na base da placa, onde permaneceu após aplicação do tratamento até a morte. Nestas placas também foi colocado um pequeno volume de fungo da colônia de origem das operárias de aproximadamente 30 mm³ para que pudessem se alimentar até o final do período de avaliação do experimento e, sempre que necessário, foram substituídas por outra de melhor qualidade. Antes de colocar as pelotas de fungo era feita uma retirada das operárias jardineiras que estivessem sobre estas pelotas, evitando a possibilidade de contaminação por ingestão do tratamento por parte da operária em estudo. As avaliações foram realizadas a cada 24 horas até os 21 dias após a aplicação.

Dados da contagem diária de operárias mortas e da duração de dias para que ocorresse a mortalidade pela ação tóxica dos tratamentos foram submetidos à análise de probit (FINNEY, 1971) para determinação da dose média letal (DL₅₀) e tempo médio letal (TL₅₀) pelo programa SAS 9.2 (SAS INSTITUTE, 2002). Fez-se a correção de mortalidade de indivíduos que foram submetidos às doses pela fórmula de Abbott (1925), e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 17 tratamentos e 40 repetições, sendo as parcelas constituídas de uma operária. Também foi realizada uma análise de regressão (teste F; P<0,05) entre a porcentagem de mortalidade e as diferentes doses/tratamento com IA (SAS INSTITUTE, 2002). Os gráficos de regressão foram elaborados com o auxílio do programa SigmaPlot 10.0.

2.3 Resultados

Na análise de dose-resposta feita de acordo com o método de probit, os tratamentos aplicados apresentaram ajuste de qualidade entre os dados estimados e os dados observados pelo teste de Qui-quadrado de Pearson, mostrando que as mortalidades observadas pelo efeito dos tratamentos corresponderam dentro dos limites estimados pelo teste, evitando a exclusão de qualquer dose dentro dos tratamentos. Portanto, o modelo verificado foi considerado adequado para descrever as relações de dose-resposta em todos os tratamentos devido à ausência de significância nos valores obtidos pelo teste de qualidade de ajuste (Tabelas 1 e 2).

A partir da mortalidade observada submetida à análise de probit é que se obtiveram os valores de DL₅₀ (dose letal que afeta 50% da população) para os IAs aplicados nas operárias com suas diferentes doses (Tabela 1). Assim, a sulfluramida obteve maior valor de DL₅₀, seguido do IA diafentiuron, do indoxacarbe e, por fim, do imidaclopride que obteve uma DL₅₀ cerca de 40 vezes menor do que a sulfluramida.

Tabela 1. Valores de DL₅₀ de ingredientes ativos aplicados por contato em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

Ingrediente Ativo	Inclinação ± ¹EP	¹DL₅₀ (µg mL⁻¹)	¹IC_{95%}	χ²*	P
Sulfluramida	2,1704 ± 1,08	245,33	7,07 – 594,69	0,0845	0,9586
Indoxacarbe	1,7539 ± 0,77	7,29	1,77 – 11,61	0,0989	0,9518
Diafentiuron	1,6000 ± 1,21	42,53	1,06 – 117,29	0,1221	0,9408
Imidaclopride	1,2289 ± 1,21	6,27	2,31 – 18,11	2,1062	0,3489

¹EP: erro padrão; DL₅₀: dose média letal; IC_{95%}: intervalo de confiança com 95% de probabilidade.

*Teste de Qui-quadrado de Pearson (P<0,05).

Para determinar os valores de TL₅₀ (tempo letal que afeta 50% da população) foi utilizada a mortalidade acumulada diária, sendo submetida à análise de probit (Tabela 2), onde o tratamento controle ficou com 36,70 dias, representando maior TL₅₀. Em

seguida, o IA sulfluramida na dose mais baixa ou inferior ($125\mu\text{g mL}^{-1}$) foi o tratamento que apresentou o maior valor de TL_{50} com 29,43 dias e na dose mais alta ou superior ($500\mu\text{g mL}^{-1}$) o menor valor: 17,36 dias. Depois, o diafentiuron com 17,45 dias na dose inferior ($137,5\mu\text{g mL}^{-1}$) e 10,67 dias na dose superior ($550\mu\text{g mL}^{-1}$). Logo após, o indoxacarbe com 17,06 dias na dose inferior ($12,5\mu\text{g mL}^{-1}$) e 8,58 dias na dose superior ($50\mu\text{g mL}^{-1}$). Por fim, o imidaclopride com os menores valores de TL_{50} , onde na dose inferior ($30\mu\text{g mL}^{-1}$) obteve-se o valor de 10,60 dias e na dose superior ($120\mu\text{g mL}^{-1}$), 5,07 dias.

Tabela 2. Valores de TL_{50} de ingredientes ativos aplicados por contato em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

Ingrediente Ativo	Dose ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Inclinação $\pm$ EP	TL_{50} (dias)	$\text{IC}_{95\%}$	χ^2*	P
Controle	0	$4,9970 \pm 0,64$	36,47	28,75 – 57,59	2,78	1,0000
Sulfluramida	125	$3,0817 \pm 0,34$	29,43	22,99 – 45,36	29,54	0,0579
	250	$4,2813 \pm 0,48$	25,82	21,70 – 34,58	27,57	0,0920
	375	$2,9662 \pm 0,31$	25,31	20,57 – 35,39	27,74	0,0884
	500	$3,3166 \pm 0,27$	17,36	15,75 – 19,62	11,21	0,9165
Indoxacarbe	12,5	$5,3247 \pm 0,43$	17,06	16,02 – 18,39	3,87	0,9999
	25	$3,7719 \pm 0,27$	9,86	9,23 – 10,49	6,23	0,9973
	37,5	$3,0010 \pm 0,31$	9,11	8,12 – 10,02	19,71	0,1026
	50	$3,6558 \pm 0,25$	8,58	8,01 – 9,13	16,92	0,5947
Diafentiuron	137,5	$6,4665 \pm 0,54$	17,45	16,52 – 18,63	3,56	1,0000
	275	$5,8948 \pm 0,48$	17,10	16,14 – 18,32	9,05	0,9725
	412,5	$6,4820 \pm 0,47$	14,10	13,48 – 14,77	6,23	0,9973
	550	$3,1400 \pm 0,23$	10,67	9,91 – 11,49	16,20	0,6437
Imidaclopride	30	$2,7567 \pm 0,21$	10,60	9,76 – 11,51	21,82	0,2929
	60	$2,5072 \pm 0,24$	10,58	9,40 – 11,91	28,76	0,0698
	90	$2,5626 \pm 0,24$	8,58	7,57 – 9,50	30,09	0,0506
	120	$2,4534 \pm 0,19$	5,07	4,61 – 5,52	22,44	0,2624

EP: erro padrão; TL_{50} : tempo médio letal; $\text{IC}_{95\%}$: intervalo de confiança com 95% de probabilidade.

*Teste de Qui-quadrado de Pearson ($P < 0,05$).

Após 21 dias de aplicação os dados de porcentagem de mortalidade foram submetidos para análise da eficiência de tratamentos com IA pela fórmula de Abbott (1925) (Tabela 3). Apenas os tratamentos com o IA indoxacarbe na dose de $50\mu\text{g mL}^{-1}$ e imidaclopride nas doses de 90 e $120\mu\text{g mL}^{-1}$ obtiveram eficiência de controle de operárias acima de 90% após o período de avaliação. Vale ressaltar que estes valores de eficiência são baseados na porcentagem de mortalidade do tratamento controle que foi de 12,50%, sendo dependente da mortalidade deste tratamento.

Tabela 3. Eficiência de controle pela aplicação de ingredientes ativos em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* após 21 dias de aplicação por contato.

Ingrediente Ativo	Dose ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mortalidade (%) [*]
Sulfluramida	125	27,58
	250	31,03
	375	37,93
	500	48,27
Indoxacarbe	12,5	55,17
	25	82,75
	37,5	89,65
	50	93,10
Diafentiuron	137,5	58,62
	275	68,96
	412,5	75,82
	550	82,75
Imidaclopride	30	82,75
	60	86,20
	90	93,10
	120	100,00

^{*}Valores obtidos pela fórmula de Abbott (1925).

Pela análise de variância de regressão, o modelo linear apresentou-se significativo para todos os IAs estudados, de acordo com o teste F ($P < 0,05$), sendo o IA diafentiuuron com maior valor de F ($F=176,33$; $P=0,0056$), seguido do imidaclopride ($F=96,33$; $P=0,0102$), da sulfluramida ($F=40,00$; $P=0,0241$) e do indoxacarbe ($F=21,73$; $P=0,0431$). As equações de regressão e a medição de proporção de variabilidade (R^2) para o modelo linear encontram-se na Figura 1.

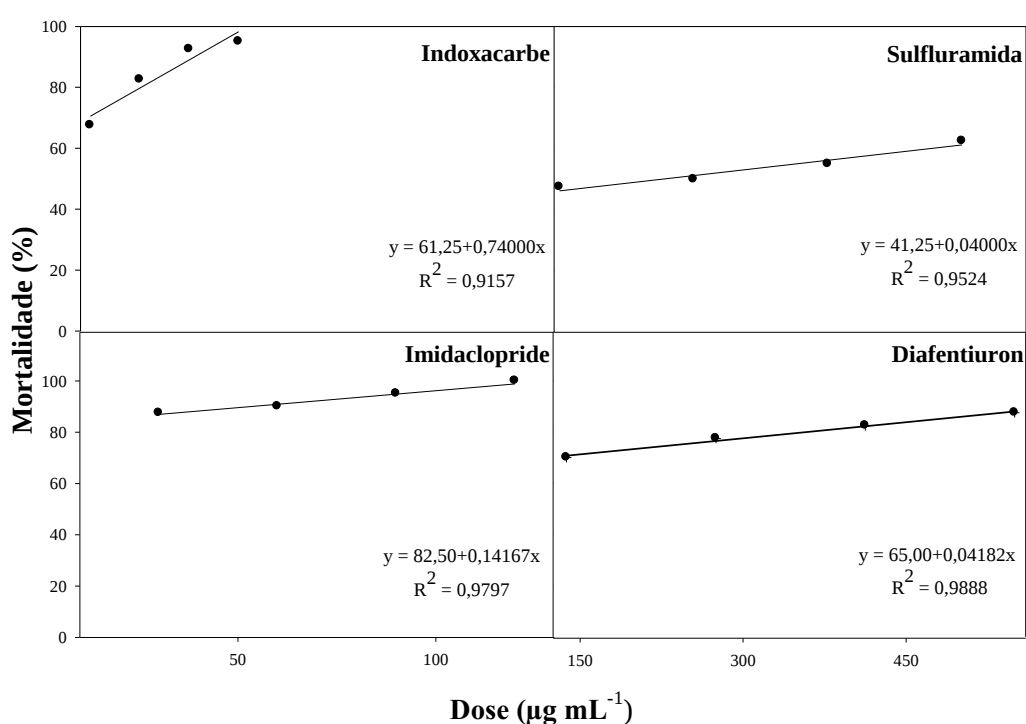


Figura 1. Estimativas de mortalidade (%) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* em função de ingredientes ativos e diferentes níveis de doses estudadas.

2.4 Discussão

A toxicidade tópica avaliada pela DL_{50} apresenta a sulfluramida com o valor mais alto, indicando que este IA pode ter de baixa a média toxicidade por esta via de aplicação em operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Este indicativo pode ser reforçado pela observação da Tabela 3, onde a eficiência de controle de sulfluramida foi abaixo de 50% da mortalidade de operárias. Apesar dessa baixa eficiência de controle por contato com o intervalo de doses em que as operárias foram submetidas, a sulfluramida ainda é o IA mais utilizado em iscas tóxicas para formigas-cortadeiras, com eficiência de controle satisfatória quando utilizado por ingestão (GROSMAN et al., 2002; FORTI et al., 2007).

Além disso, de acordo com estudo realizado por Su et al. (1994) a proporção de toxicidade oral de sulfluramida é aproximadamente 1,5 vezes maior do que a toxicidade tópica quando testado em cupins da família Rhinotermitidae, o que poderia ocorrer em espécies de Formicidae. Isto acontece porque a sulfluramida é considerada um inseticida que age na porção de absorção do aparelho digestório (mesêntero), sendo absorvido mais eficazmente por ingestão do que pela penetração no tegumento (VANDER MEER et al., 1985). Também pode ser possível que algumas espécies da mesma família de insetos apresentem maior suscetibilidade à sulfluramida do que outras, pois Su e Scheffrahn (1991) estimaram a toxicidade tópica com valores distintos de DL_{50} para duas espécies de cupins da família Rhinotermitidae.

Os valores de TL_{50} de sulfluramida também podem ser considerados elevados nas três primeiras doses, superando o período de avaliação de 21 dias que é considerado suficiente para provocar valores de mortalidade de operárias maiores que 90% pelo efeito de IA's. Entretanto, na análise de regressão o IA apresentou significância para o modelo linear, ou seja, na medida em que aumentamos a variável independente (neste caso, a dose) aumenta-se a resposta de y (variável dependente). Isto possibilitaria fazer avaliações com o aumento da dosagem e assim, alcançar altas mortalidades pela aplicação de sulfluramida, no entanto, devem ser avaliados o custo-benefício e fatores ambientais como a bioacumulação.

Analisando-se a resposta do diafentiuron quando aplicado topicamente, pode-se dizer que o mesmo se apresentou como o IA tóxico mais promissor entre os que foram

estudados visando o controle de *A. sexdens rubropilosa*. De acordo com estudo realizado por Nagamoto et al. (2004) com operárias desta espécie e diferentes IA's aplicados por ingestão, o diafentiuron se apresentou com características inseticidas mais promissoras para se tornar um bom formicida do que os demais testados, pois se apresentou mais tóxico (baixa dose letal) quando aplicado por via oral do que o inseticida padrão (sulfluramida) (DL_{50} de diafentiuron foi 5,76 vezes menor), o qual já é recomendado para o controle de algumas espécies de formigas-cortadeiras.

O diafentiuron vem sendo reportado como inseticida e acaricida para uma série de grupos de insetos (KEUM et al., 2002; DEKEYSER, 2005; STANLEY et al., 2010), atuando principalmente como inibidor da respiração mitocondrial pela produção de carbodiimida (RUDER et al., 1991). O modo de ação de carbodiimida é semelhante ao produzido pela sulfluramida por atuarem na respiração celular, tornando-os inseticidas de ação retardada, sendo esta semelhança uma característica interessante para planejar o seu emprego no controle de formigas-cortadeiras. Contudo, somente no nível superior de dose aplicada de diafentiuron ($550\mu\text{g mL}^{-1}$), é que se obteve eficiência de controle de operárias de 82,75%. O tempo letal da aplicação de $550\mu\text{g mL}^{-1}$ de diafentiuron foi de aproximadamente 11 dias, os quais podem ser suficientes para provocar a contaminação pelo comportamento de limpeza (*self-grooming* e *allogrooming*) pelas operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

Além disso, o diafentiuron necessita ser convertido para o correspondente carbodiimida, que é o provável responsável por esta atividade bioquímica sobre insetos, sendo esta conversão dependente principalmente de um processo fotoquímico (KAYSER; EILINGER, 2001; KEUM et al., 2002). Neste experimento o diafentiuron não foi submetido a nenhum processo que favorecesse tal conversão, o que poderia aumentar a sua eficiência de controle.

Por outro lado estão os IA's testados que obtiveram valores de DL_{50} inferiores aos da sulfluramida e diafentiuron. Dentre estes, estão o indoxacarbe e o imidaclopride, onde o primeiro apresentou valor de DL_{50} acima do estimado para o imidaclopride. Ambos atingiram os menores valores de TL_{50} demonstrando serem formicidas muito tóxicos por ação tópica e com eficiência de controle acima de 90% nas últimas dosagens estudadas, além da significância para o modelo linear de regressão.

Indoxacarbe tem demonstrado ser um potente inseticida bloqueador de canais de sódio para larvas (Lepidoptera), insetos raspadores e sugadores em baixa DL_{50} por ação tópica e oral, sendo altamente ativo e de largo espectro (WING et al., 2000). Barr (2003) aplicou iscas com indoxacarbe em trilhas de campo para o controle de *S. invicta* e relatou a ação rápida deste IA quando adicionado em formulações para isca, sugerindo-o como um inseticida alternativo de contato. Já Chong e Lee (2009) obtiveram mortalidade acima de 96% quando utilizada isca líquida de cana-de-açúcar com 0,05% de indoxacarbe contra populações de campo de *Anoplolepis gracilipes* (Fr. Smith) (Hymenoptera: Formicidae).

O imidaclopride é um inseticida pertencente ao grupo dos neonicotinoides atuando em receptores pós-sinápticos nicotínicos de acetilcolina, podendo reduzir a sobrevivência de insetos em poucas horas por contato devido à aplicação direta ou pelo contato com algum resíduo desse inseticida (CLOYD; BETHKE, 2011). Por exemplo, em abelhas, imidaclopride exibe alta toxicidade, sendo que em até 48 horas, a DL_{50} oral e de contato pode ser de 5 e 25ng por abelha, respectivamente (SUCHAIL et al., 2003).

As características apresentadas neste estudo sobre o indoxacarbe e o imidaclopride os tornam potenciais formicidas de ação rápida, permitindo sua utilização em algumas formulações para formicidas de contato (por exemplo, pó seco), mas que ofereceriam dificuldades de controle se estes IA's fossem empregados em iscas tóxicas, pois não apresentaram as características desejáveis para tal. Estudos que apresentem avaliações mais rigorosas e mais específicas, principalmente quanto a formulações de formicidas com estes IA's devem ser realizados antes de serem recomendados, pois dependendo do resultado destas avaliações, os IA's podem apresentar de forma mais nítida o seu potencial como formicida para o controle de formigas-cortadeiras.

2.5 Conclusão

A toxicidade da sulfluramida pode ser considerada baixa quando comparada com os demais IA testados, pois apresentou alta DL_{50} e alto TL_{50} , produzindo um efeito muito retardado para o controle por ação de contato. Entretanto, o ingrediente diafentiuron se apresentou promissor diante dos dados de dose média letal e tempo médio

letal, podendo ser mais eficiente se permitido algum processo de bioativação de seu metabólito carbodiimida (inseticida eficaz) e assim, ser planejado para uso em iscas formicidas. Já os IA's indoxacarbe e imidaclopride apresentaram baixa DL_{50} e baixo TL_{50} , principalmente nas doses mais elevadas, mas apresentaram eficiência de controle acima de 90%, tornando-os promissores formicidas por ação de contato para operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

Capítulo III

MORTALIDADE DE OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) APÓS PROCESSO DE FOTÓLISE DE DIAFENTIURON

Resumo

Diafentiuron é um pré-inseticida/acaricida que pode ser transformado em carbodiimida pelo processo de fotólise em luz ultravioleta, catalisando-se com água. Com a fotólise, diafentiuron pode se tornar um potente formicida, podendo ser oferecido em isca pastosa. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a mortalidade de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* após a fotólise de diafentiuron. Operárias oriundas de colônias de laboratório foram utilizadas para oferecimento dos tratamentos (iscas) contendo os ingredientes ativos. Os tratamentos foram: 1- controle; 2- sulfluramida [0,3%]; 3- diafentiuron (sem exposição à luz UV); 4- diafentiuron (2h de luz UV); 5- diafentiuron (4h de luz UV) e 6- diafentiuron (6h de luz UV). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 4 repetições. Aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$), com comparações de postos médios pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$), além da estimativa de TL_{50} (método probit). Sulfluramida e diafentiuron (sem luz UV) ficaram na classe III (compostos de ação retardada). Tratamentos com diafentiuron que receberam luz UV se enquadraram na classe II (compostos de ação rápida). Houve semelhança entre os tratamentos com ingrediente ativo na porcentagem de mortalidade de operária. Somente operárias do tratamento controle não apresentaram sintomas de intoxicação. A estimativa dos valores de TL_{50} mostra que diafentiuron após fotólise em luz UV apresenta toxidez para operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

Palavras-chave: formigas-cortadeiras, ingestão, mortalidade, controle.

MORTALITY OF *Atta sexdens rubropilosa* WORKERS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) AFTER PHOTOLYSIS PROCESS OF DIAFENTHIURON

Summary

Diafenthiuron is a pre-insecticide/acaricide which can be transformed in carbodiimide by photolysis in UV light, catalyzing with water. With photolysis, diafenthiuron can become a potent formicidal and can be offered in pasty bait. The objective of this study was to evaluate the mortality of *Atta sexdens rubropilosa* workers after photolysis of diafenthiuron. Workers from the laboratory colonies were used for offering treatments (baits) containing the active ingredients. The treatments were: 1 - control, 2 - sulfluramid [0.3%]; 3 - diafenthiuron (without exposure to UV light) 4 - diafenthiuron (2h UV light) 5 - diafenthiuron (4h UV light) and 6 - diafenthiuron (6h UV light). The experiment was conducted in a completely randomized design with 6 treatments and 4 replications. We applied the Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$), with comparisons of means made by the Student-Newman-Keuls test ($P < 0.05$), besides the estimate of LT_{50} (probit method). Sulfluramid and diafenthiuron (without UV light) were in class III (delayed action compounds). Treatments with diafenthiuron receiving UV light fell into class II (fast acting compounds). There were similar between treatments with the active ingredient in the mortality of workers. Only workers of the control treatment showed no symptoms of intoxication. The estimation of LT_{50} shows that diafenthiuron after photolysis in UV light shows toxicity to workers of *A. sexdens rubropilosa*.

Keywords: leaf-cutting ants, ingestion, mortality, control.

3.1 Introdução

As formigas-cortadeiras (Formicidae: Myrmicinae: Attini) são importantes pragas agrícolas da região Neotropical. Entre estas, encontra-se a espécie *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 que é popularmente conhecida como saúva-limão (BOARETTO; FORTI, 1997). Os danos que esta espécie causa as plantações podem ser reduzidos com o uso de iscas contendo um ingrediente ativo (IA), conferindo-lhe ação tóxica (ZANETTI et al., 2004).

Entretanto, a busca por novos IA's que atuem por ingestão e que possuam ação retardada para permitir uma boa dispersão do formicida sobre a colônia é considerada de difícil sucesso, devido ao comportamento destes insetos (FORTI et al., 1998; CAMARGO et al., 2003).

Por outro lado, diafentiuron pode ser relativamente considerado um dos mais recentes IA's devido a sua reconhecida performance em produtos com função inseticida e acaricida (RAJABASKAR; REGUPATHY, 2008). É ativo contra várias espécies de insetos sugadores e alguns lepidópteros-praga, além de alguns ácaros de importância agrícola (PETROSKE; CASIDA, 1995). Por ser do grupo químico tiourea, apresenta-se com um único mecanismo de ação, que é a inibição da respiração celular mitocondrial em insetos, podendo ser ou não seletivo para algumas espécies, provocando toxicidade tópica ou por via oral (RUDER et al., 1991).

Diafentiuron é um pré-inseticida que precisa ser submetido ao processo de fotólise para ser metabolizado. O principal metabólito resultante deste

processo é a carbodiimida (59% é transformado em até 24 horas) que pode se degradar mais lentamente que seu precursor, tornando-se um potente inseticida. A fotólise pode ser direta ou indireta, podendo ocorrer naturalmente em condições de campo. A maior absorção de luz pelo inseticida ocorre próximo do ultravioleta ou da faixa de luz visível, podendo ser decomposto diretamente por luz solar. Este processo ainda pode ser catalisado com adição de água (KEUM et al., 2002).

As condições em que diafentiuron precisa ser submetido podem ser relevantes no emprego de IA's em formicidas granulados, pois seu uso está ligado às atividades de campo, onde as iscas são expostas às diversas condições do tempo, podendo ou não favorecer a formulação e com isto permitir que sua ação como inseticida seja efetiva no controle de formigas-cortadeiras. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a mortalidade de operárias de *A. sexdens rubropilosa* após o diafentiuron ser submetido ao processo de fotólise e oferecido na forma de isca pastosa.

3.2 Material e Métodos

Colônias da criação do Laboratório de Insetos Sociais-Praga (Lisp), localizado na FCA/UNESP, Botucatu, SP, foram mantidas em recipientes plásticos com volume de 5L e com camada de 1,5 cm de gesso na parte inferior para manter a umidade, fornecendo-se substrato vegetal fresco das espécies *Ligustrum* sp. (Oleaceae) e *Acalypha* sp. (Euphorbiaceae). Destas, foram retirados os fragmentos fúngicos contendo operárias menores (jardineiras), como também as operárias com largura de cabeça maior que 2 mm. O experimento foi conduzido nas condições climáticas do laboratório ($24^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa de $70\% \pm 5$).

Formularam-se iscas de consistência pastosa, contendo os seguintes componentes: IA (sulfluramida ou diafentiuron), polpa cítrica, óleo, açúcar e água. Todas as formulações foram preparadas com base na relação peso/peso (p/p). Antes de adicionado na isca, o IA diafentiuron (10mg) foi diluído em uma solução contendo água + acetona (proporção 1 mL de água + 9 mL de acetona) e submetido a diferentes tempos de

exposição à luz ultravioleta (UV) com pico de 253nm de comprimento de onda (TUV-30W T8, Philips Electronics Brasil®).

Esse método de exposição de diafentiuon à luz UV foi adaptado e modificado de Keum et al. (2002), pois o IA precisa ser diluído em solvente, mas não poderia apresentar água em excesso, pois levaria muitas horas para ocorrer a evaporação em capela, nem tão pouco usar clorofórmio devido ao seu oferecimento para as operárias. Além disso, o excesso de água dificultaria a formação da consistência pastosa da isca.

Os tempos de exposição de diafentiuon foram de 0, 2, 4 e 6h de luz UV, seguidos de 24, 22, 20 e 18h de escuro, respectivamente, estabelecendo-se um ciclo de 24 horas para o processo de degradação de diafentiuon em solução de acetona + água. Assim, cada tempo de exposição à luz se constituiu em tratamentos [diafentiuon (0, 2, 4 e 6h de luz)], além do controle (ausência de IA) e do tratamento com sulfluramida [(0,3%) – IA padrão], totalizando 6 tratamentos. O tratamento contendo sulfluramida foi diluído em acetona antes de ser adicionado à isca.

Em seguida, foram formados grupos de 22 operárias (largura da cabeça maior que 2 mm) e colocadas em recipientes plásticos de 250 mL de volume com camada de 1,5 cm de gesso, com a aplicação da isca pastosa sobre papel alumínio contendo cada um dos tratamentos. Foram aplicados 4,6g de isca por recipiente e, após 24 horas, retirou-se a isca e descartaram-se duas operárias (formigas mortas ou moribundas), colocando-se uma pelota de fungo (aproximadamente 3 cm³) da colônia da qual foram coletadas as operárias (BASS; CHERRETT, 1996). Foram adicionadas 22 operárias da casta das jardineiras para manterem os cuidados com o cultivo do fungo, aumentando-se a sobrevivência de operárias pela prevenção da deficiência nutricional (NAGAMOTO et al., 2007).

As avaliações foram realizadas pela mortalidade acumulada e presença de sintomas por intoxicação em operárias (largura de cabeça maior que 2 mm), no período de 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17 e 21 dias após a aplicação das iscas. A mortalidade foi corrigida e ajustada pela fórmula de Abbott (1925) e depois classificada pela proposta adaptada de Nagamoto et al. (2004), pois não existiram IA's com diferentes concentrações: classe I – composto com pouca ou nenhuma atividade inseticida e taxa de mortalidade < 90% até 21 dias; classe II – composto com ação rápida (mortalidade > 15%

em 24 horas e > 90% com 21 dias); classe III – composto com ação retardada (mortalidade < 15% em 24 horas, mas > 90% com 21 dias). Os sintomas de intoxicação foram analisados seguindo uma escala para cada grupo de 5 formigas, de acordo com Nagamoto et al. (2007). Assim: 0 – quando não se observou sintoma; 0,5 – quando parte (50%) dos indivíduos demonstraram sintomas e 1 – quando todos os indivíduos apresentaram sintomas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 4 repetições, sendo cada repetição representada por um recipiente com 20 operárias. Para a mortalidade acumulada, realizou-se uma análise de variância e uma avaliação da distribuição dos dados (homogeneidade). Para isto, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk ($P < 0,05$), rejeitando-se a distribuição normal dos dados e assim, aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$), com comparações de postos médios pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$) pelo programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

Com as porcentagens médias de mortalidade foi possível realizar três análises: a primeira refere-se às prováveis diferenças que ocorrem entre os tratamentos para cada dia avaliado; a segunda à provável diferença na mortalidade dentro do tratamento, quando analisado isoladamente e a terceira à classificação dos tratamentos de acordo com Nagamoto et al. (2004).

Também foram determinados os valores de TL_{50} (tempo médio letal), com os dados de mortalidade acumulada ao final do período avaliado (21 dias após aplicação da isca pastosa) por meio do método de probit (FINNEY, 1971), ajustando-se os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado de Pearson ($P < 0,05$) com o auxílio do programa SAS 9.2 (SAS INSTITUTE, 2002).

3.3 Resultados

As porcentagens médias de mortalidade acumulada após 21 dias do oferecimento de isca pastosa contendo IA's encontram-se na Tabela 1. Quanto aos tempos de avaliação, é possível observar que os tratamentos diferiram significativamente em todos

os dias avaliados, entretanto, a partir do 14º dia todos os tratamentos, exceto o controle, já haviam determinado 100% de mortalidade de operárias, com destaque para os tratamentos com diafentiuron que foram expostos à luz UV, que determinaram essa porcentagem de mortalidade a partir do 5º dia de avaliação. Contudo, no 1º dia de avaliação a mortalidade foi de 10,0%, 16,2%, 25,0% e 32,5% para diafentiuron 0h, 2h, 4h e 6h, respectivamente, mostrando que o aumento da exposição foi proporcional ao aumento da mortalidade no início da avaliação.

Quanto à mortalidade ocasionada em cada tratamento individualmente (Tabela 1), apenas o tratamento controle não apresentou diferença significativa, levando-se em consideração o aumento de dias após a aplicação. Com este resultado é possível afirmar que a mortalidade ocorrida no controle pode ser considerada natural, permitindo a constatação do efeito de IA's sobre as operárias.

Quanto à classificação dos IA's de acordo com a porcentagem de mortalidade das operárias, os tratamentos sulfluramida e diafentiuron (0h) se enquadraram na classe III (composto com ação retardada- mortalidade < 15% em 24 horas, mas > 90% com 21 dias). Os tratamentos com diafentiuron expostos ao processo de fotólise com luz UV se enquadraram na classe II (composto com ação rápida - mortalidade > 15% em 24 horas e > 90% com 21 dias). Vale ressaltar, que esta classificação não leva em consideração a concentração dos tratamentos, mas sim, a porcentagem da mortalidade acumulada e o tempo para que a mesma ocorra.

De modo geral, aos 21 dias após o oferecimento das iscas todos os tratamentos com IA diferiram do tratamento controle ($H=30,16$; $P=0,0001$), não diferindo significativamente entre si (Tabela 2).

Tabela 1. Porcentagem da mortalidade acumulada de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* após oferecimento de isca pastosa contendo sulfluramida (formicida padrão) e diafentiuuron (diferentes níveis de exposição à luz UV) de acordo com o período de avaliação.

Dias	Tratamentos						
	Média (%) (IC _{95%})*						
	Controle	Sulfluramida	Diafentiuuron (0h)	Diafentiuuron (2h)	Diafentiuuron (4h)	Diafentiuuron (6h)	H
1	0,0 (0,0-0,0)a	11,2 (3,6-18,8)abA	10,0 (7,1-27,1)abA	16,2 (8,6-23,8)bcA	25,0 (3,4-46,5)bcA	32,5 (24,5-40,4)cA	17,15
2	2,5 (1,4-6,4)a	27,5 (17,2-37,7)abAB	37,5 (20,9-54,0)bcAB	40,0 (22,8-57,1)bcA	48,7 (24,1-73,3)bcA	58,7 (38,8-78,6)cA	17,01
3	3,7 (3,4-10,9)a	48,7 (14,7-82,7)abABC	83,7 (66,1-101,3)bcABC	92,5 (87,9-97,0)cAB	88,7 (75,1-102,3)cAB	90,0 (77,0-102,9)cAB	17,16
5	5,0 (4,5-14,5)a	62,5 (36,1-88,8)abABC	96,2 (88,6-103,8)bcBC	100,0 (0,0-0,0)cB	100,0 (0,0-0,0)cB	100,0 (0,0-0,0)cB	21,15
7	6,2 (3,7-16,2)a	85,0 (73,7-96,2)abBCD	97,5 (89,5-105,4)bcC	100,0 (0,0-0,0)cB	100,0 (0,0-0,0)cB	100,0 (0,0-0,0)cB	21,05
9	7,5 (2,7-17,7)a	93,7 (83,7-103,7)abCD	98,7 (94,7-102,7)bc	100,0 (0,0-0,0)bbB	100,0 (0,0-0,0)bbB	100,0 (0,0-0,0)bbB	18,64
11	8,7 (1,2-18,7)a	97,5 (89,5-105,4)bCD	100,0 (0,0-0,0)bc	100,0 (0,0-0,0)bbB	100,0 (0,0-0,0)bbB	100,0 (0,0-0,0)bbB	19,84
14	8,7 (1,2-18,7)a	100,0 (0,0-0,0)bdD	100,0 (0,0-0,0)bc	100,0 (0,0-0,0)bbB	100,0 (0,0-0,0)bbB	100,0 (0,0-0,0)bbB	22,76
17	8,7 (1,2-18,7)a	100,0 (0,0-0,0)bdD	100,0 (0,0-0,0)bc	100,0 (0,0-0,0)bbB	100,0 (0,0-0,0)bbB	100,0 (0,0-0,0)bbB	22,76
21	8,7 (1,2-18,7)a	100,0 (0,0-0,0)bdD	100,0 (0,0-0,0)bc	100,0 (0,0-0,0)bbB	100,0 (0,0-0,0)bbB	100,0 (0,0-0,0)bbB	22,76
H	9,56 ^{ns}	36,50	31,38	38,84	36,42	36,61	-
P	0,3872	0,0001	0,0003	0,0001	0,0001	0,0001	-

*Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05) com comparações de postos médios feitos pelo teste Student-Newman-Keuls (P<0,05); IC_{95%}: intervalo de confiança com 95% de probabilidade.

Tabela 2. Porcentagem média da mortalidade acumulada de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* após oferecimento de isca pastosa contendo sulfluramida (formicida padrão) e diafentiuron (diferentes níveis de exposição à luz UV).

Tratamentos	Média (%) (IC_{95%}) *
Controle	6,00 (3,77-8,22) a
Sulfluramida	72,62 (48,84-96,39) b
Diafentiuron (0h)	82,37 (59,51-105,22) b
Diafentiuron (2h)	84,87 (63,03-106,70) b
Diafentiuron (4h)	86,25 (67,04-105,45) b
Diafentiuron (6h)	88,12 (71,34-104,89) b

*Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) com comparações de postos médios feitos pelo teste Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$); IC: intervalo de confiança com 95% de probabilidade.

Quanto à evolução dos sintomas de intoxicação após o oferecimento da isca pastosa (Figura 1), a isca contendo sulfluramida iniciou com valor entre 0,0 e 0,5 atingindo valor 1 (máximo) em até 7 dias após o oferecimento da isca, continuando com este até o 21º dia, mas alcança 100% de mortalidade no 14º dia de avaliação. Diafentiuron (0h) foi semelhante a sulfluramida, mas atingiu 100% de mortalidade de operárias no 11º dia de avaliação. Diafentiuron (2h) e diafentiuron (4h) apresentaram sintomas em tempos semelhantes, alcançando valor 1,0 entre o primeiro e o sétimo dia de avaliação, mas com início de sintoma semelhante a sulfluramida e diafentiuron (sem exposição). Já as operárias que receberam diafentiuron (6h) iniciaram seus sintomas com valores superiores aos tratamentos anteriores entre 0,5 e 1,0 em até sete dias de avaliação, onde atingiu 100% de mortalidade durante este período. Não foi observado nenhum sintoma de intoxicação nas formigas que receberam o tratamento controle, que permaneceu com valor zero até o final do período avaliado.

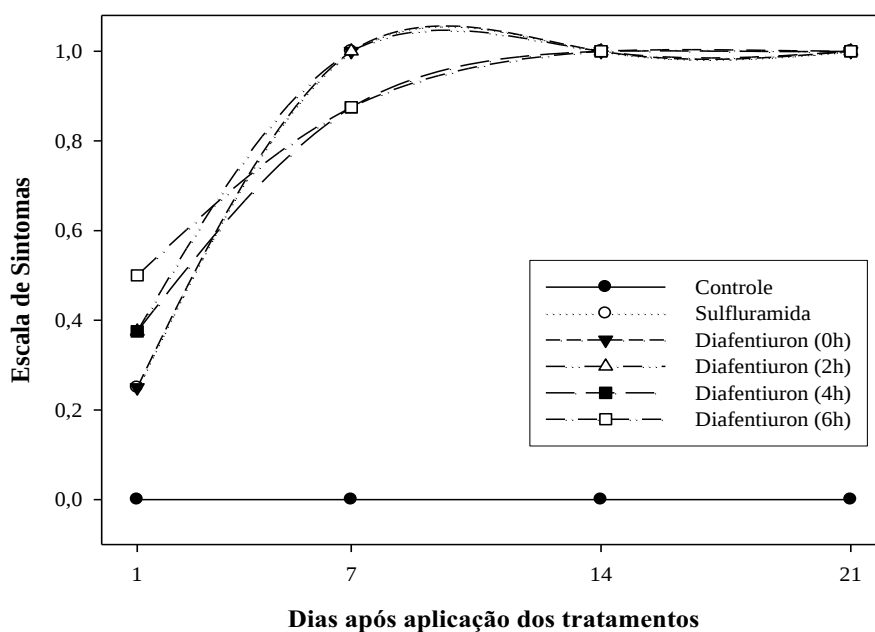


Figura 1. Evolução dos sintomas de intoxicação após a indução de ingestão de sulfluramida (formicida padrão) e diafentiuron (diferentes níveis de exposição à luz UV) em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

Outra análise que contribui no estudo de toxicidade de IA's sobre insetos é a estimativa do tempo médio letal (TL_{50}) (Tabela 3). Nota-se que todos os tratamentos estão ajustados de acordo com o teste de Qui-quadrado de Pearson ($P < 0,05$), pois a estimativa da mortalidade observada não diferiu da estimativa da mortalidade esperada para cada dia de avaliação definido no experimento. Assim, o tratamento controle obteve o maior valor de TL_{50} , permitindo uma estimativa de sobrevivência de aproximadamente 224 dias. Entretanto, quando se analisa a estimativa dos tratamentos contendo IA's, percebe-se uma nítida diferença provocada pelo efeito tóxico do IA, pois os valores foram muito baixos, destacando-se os tratamentos com diafentiuron expostos a luz UV, o que comprova sua toxidez em operárias de *A. sexdens rubropilosa* por ingestão.

Tabela 3. Valores de TL₅₀ de sulfluramida (formicida padrão) e diafentiuron (diferentes níveis de exposição à luz UV) aplicados por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

Tratamento	Inclinação ± EP	TL ₅₀ (dias)	IC _{95%}	χ^2 *	P
Controle	2,4518 ± 0,27	223,80	61,88-716,22	0,25	0,9584
Sulfluramida	1,5044 ± 0,13	3,06	2,76-3,36	1,59	0,1204
Diafentiuron (0h)	1,3558 ± 0,15	2,08	1,89-2,27	1,21	0,2844
Diafentiuron (2h)	0,9983 ± 0,16	1,54	1,38-1,73	0,06	0,9996
Diafentiuron (4h)	0,7353 ± 0,18	1,53	1,25-1,80	1,90	0,0549
Diafentiuron (6h)	0,6387 ± 0,13	1,45	1,29-1,61	1,10	0,3542

EP: erro padrão; TL₅₀: tempo médio letal; IC_{95%}: intervalo de confiança com 95% de probabilidade.

*Teste de Qui-quadrado de Pearson (P<0,05).

3.4 Discussão

A submissão de diafentiuron à luz UV potencializa sua transformação pelo processo de fotólise, ao possibilitar uma transformação metabólica no composto carbodiimida, tornando-se um potente inseticida (KEUM et al., 2002). Esta potencialidade foi comprovada neste experimento, quando diafentiuron foi exposto a diferentes horas de luz UV e, em seguida, oferecido em isca pastosa às operárias de *A. sexdens rubropilosa*, obtendo-se mortalidade de 100% em até 5 dias após a ingestão desse IA (Tabela 1).

Diafentiuron pode agir tanto topicamente como por ingestão em insetos e ácaros, entretanto, sua ação tóxica pode ser acelerada ao ser transformado em carbodiimida, matando o inseto mais rapidamente. Além disso, em estudo realizado por Kadir e Knowles (1991), sugere-se que a carbodiimida seja o precursor de uma nova classe de agonistas octopamina, indicando sua ação neurotóxica em alguns insetos e ácaros, pois os autores verificaram alguns sintomas que eram semelhantes aos provocados por outros inseticidas/acaricidas neurotóxicos. Esta sugestão pode explicar a alta mortalidade que os tratamentos com diafentiuron expostos à luz UV apresentaram após o 1º dia de avaliação, chegando a 32,50% de mortalidade de operárias com diafentiuron (6h).

Este resultado foi responsável pelo enquadramento dos tratamentos com diafentiuron com exposição à luz UV na classe II, sugerindo que seu uso como isca formicida deva ser descartado, a não ser que sua concentração seja modificada ou seu uso empregado em outras formulações ou até na própria isca granulada (método mais empregado para controle químico de formigas-cortadeiras), pois existe relato na literatura de que diafentiuron pode ou não ser seletivo para insetos.

Por outro lado, é possível verificar a diferença de diafentiuron sem exposição à luz UV dos tratamentos que a receberam, pois a mortalidade de operárias atingiu 100% após 11 dias do oferecimento da isca pastosa, assemelhando-se ao IA sulfluramida (considerado formicida padrão). De acordo com o sugerido por Nagamoto et al. (2004), deve ser enquadrado na classe III, apresentando-se como um IA de ação retardada para operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

Apesar da sugestão realizada por Kadir e Knowles (1991), a maioria dos pesquisadores que estudam o efeito tóxico de diafentiuron em insetos e ácaros relata seu mecanismo na respiração celular mitocondrial, semelhante ao da sulfluramida que possui o mesmo mecanismo de ação. Entretanto, Kayser e Eilinger (2001) explicam que o metabolismo de diafentiuron por oxidação microsomal pode inativar seus metabólitos secundários, provocando efeito tóxico inibitório. Estes autores também sugerem que este processo de ativação de carbodiimida é dependente de uma ação enzimática, podendo ser transformado em ureia, por exemplo, e não provocar a toxidez em insetos.

De acordo com Forti et al. (1998), IA's que apresentam ação retardada são de relevante importância para serem utilizados em iscas formicidas, pois podem provocar a contaminação de grande parte das operárias e elevar a mortalidade da colônia pela maior possibilidade de contaminação pelo IA; devido aos comportamentos específicos de sociabilidade das formigas do gênero *Atta* como, por exemplo, a manipulação minuciosa de substratos forrageados antes de incorporá-los no cultivo de fungo. Neste experimento, as operárias ainda mantinham seu contato com operárias menores e com seu fungo simbiote, após ingerirem a isca pastosa.

Apesar do interesse em IA's que possam ser empregados em iscas formicidas, não se descarta a possibilidade de uso de diafentiuron exposto à luz UV como formicida, pois atingiu boa eficiência de mortalidade (Tabela 2) após a ingestão pelas

operárias de *A. sexdens rubropilosa*, devendo ser melhor investigado, pois de acordo com Nagamoto et al. (2004), a classificação do IA é passível de alteração conforme a concentração utilizada, com possibilidade de atingir a classe III.

Quanto aos sintomas de intoxicação, operárias tratadas com diafentiuron (sem luz UV) apresentaram baixa mobilidade e desorientação, principalmente no par de pernas posterior que ora permaneciam levantados. Operárias de *A. sexdens rubropilosa* quando tratadas com sulfluramida também apresentam baixa mobilidade devido à baixa produção de energia como consequência do seu mecanismo de ação. Estes sintomas foram visíveis nos primeiros dias após o oferecimento das iscas, e está de acordo com a avaliação e observação realizada por Nagamoto et al. (2004) usando a escala de sintomas.

Quando se faz uma análise dos valores de TL_{50} fica evidente a velocidade da ação dos IA's empregados nas iscas deste experimento. Os tratamentos com diafentiuron que foram expostos à luz UV obtiveram valores mais baixos, aproximadamente a metade do valor obtido pela ingestão de sulfluramida, mostrando sua ação rápida. Observando-se a Tabela 1, é possível notar que 50% da população de operárias tratadas com sulfluramida morreram entre o terceiro e o quinto dia após a aplicação, o que seria tempo suficiente para permitir a dispersão do IA (FORTI et al., 2007).

Na literatura existem diversos trabalhos que relatam a toxicidade tópica e oral de diafentiuron em insetos, mas a maioria deles apresenta a DL_{50} (dose média letal) ou a CL_{50} (concentração média letal) com o objetivo de avaliar a seletividade de diafentiuron; entretanto, poucos destes apresentam o TL_{50} , dificultando a comparação com outros resultados, principalmente com formigas-cortadeiras.

3.5 Conclusão

O oferecimento de isca pastosa contendo diafentiuron submetido ao processo de fotólise à luz UV provoca mortalidade de operárias de *A. sexdens rubropilosa* acima de 80% entre o terceiro e quinto dia após a aplicação. Entretanto, nestas condições é considerado um IA de ação rápida, pois fica enquadrado na classe II e seus valores estimados para TL_{50} também são baixos, indicando toxicidade por ingestão. Outras concentrações de

diafentiuron deverão ser testadas sob o processo de fotólise, a fim de avaliar se é possível alterar a classe do IA.

Capítulo IV

APLICAÇÃO DE ISCAS GRANULADAS CONTENDO DIAFENTIURON EM COLÔNIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Resumo

O controle químico das formigas-cortadeiras com o uso de iscas formicidas é a principal forma de controle destes insetos, entretanto, a busca de novos ingredientes ativos é um grande desafio. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diafentiuron adicionado em isca granulada após o processo de fotólise em colônias de *A. sexdens rubropilosa*. Foram utilizadas colônias de laboratório, oferecendo-se folhas de *Acalypha* sp. como substrato vegetal. As iscas aplicadas representaram os seguintes tratamentos: 1- controle (sem ativo); 2- sulfluramida (formicida padrão); 3- diafentiuron (sem exposição à luz UV); 4- diafentiuron (2h de exposição à luz UV) e; 5- diafentiuron (6h de exposição à luz UV). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 5 repetições. As operárias das colônias que receberam sulfluramida não realizaram nenhum carregamento de folhas 2 DAA. Operárias que receberam iscas com diafentiuron (2h) apresentaram média de 20% de carregamento e 55% de incorporação de folhas aos 21 DAA. Na avaliação da escala de notas no corte de folhas de *Acalypha* sp., os tratamentos expostos à luz UV obtiveram as menores médias. A massa da câmara de fungo de *A. sexdens rubropilosa* foi maior no tratamento controle devido à ausência de ativo. Somente a sulfluramida foi capaz de matar as colônias. Os tratamentos contendo diafentiuron (2h e 6h) conseguiram reduzir o corte de folhas e amassa do jardim de fungo, mas não mataram as colônias de *A. sexdens rubropilosa*.

Palavras-chave: formigas-cortadeiras, *Acalypha* sp., fotólise, controle químico.

Chapter IV

APPLICATION OF GRANULATED BAITS CONTAINING DIAFENTHIURON IN COLONIES OF *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Summary

Chemical control of leaf-cutting ants using formicidal baits is the main way to control these insects, however, the search for new active ingredients is a challenge. The objective of this study was to evaluate the effect of diafenthiuron added to granulated bait after the process of photolysis in colonies of *A. sexdens rubropilosa*. We used laboratory colonies, offering up leaves of *Acalypha* sp. as vegetal substrate. The applied baits accounted the following treatments: 1 - control (no active) 2 - sulfluramid (formicidal standard) 3 - diafenthiuron (without exposure to UV light) 4 - diafenthiuron (2h UV light) and, 5 - diafenthiuron (6h UV light). The experiment was conducted in a completely randomized design with 5 treatments and 5 replicates. The workers of the colonies that received sulfluramid not perform any load leaves 2 DAA. Workers who received diafenthiuron (2h) baits showed an average 20% load and 55% incorporation of leaves at 21 DAA. In the evaluation of scale notes in cutting leaves of *Acalypha* sp. the treatments exposed to UV light had the lowest average. The weight of the fungus chamber in *A. sexdens rubropilosa* was higher in the control treatment due to default of active. Only sulfluramid was able to kill the colonies. Treatments containing diafenthiuron (2 and 6h) managed to reduce the cutting leaves and weight of sponge fungal, but not killed colonies of *A. sexdens rubropilosa*.

Keywords: leaf-cutting ants, *Acalypha* sp., photolysis, chemical control.

4.1 Introdução

O controle químico de formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae) sem contaminar os agroecossistemas é um grande desafio para o setor agropecuário (BOARETTO; FORTI, 1997). Dentre as formigas que são alvos de controle encontra-se a espécie *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, que ataca principalmente cultivos de espécies florestais e outras de importância agrícola.

O principal desafio no controle destas formigas está na busca de inseticidas que contenham características físico-químicas desejadas, as quais permitam diminuir sua ação no ambiente, mas que também sejam eficientes contra estes insetos. Além disso, estas características são de grande interesse para que possam ser formulados como iscas tóxicas granuladas (FORTI et al., 1998).

Muitos inseticidas já foram utilizados em experimentos para o controle destas formigas como, por exemplo, clorpirifós (FORTI et al., 2003), diflubenzuron e decolorano (NAGAMOTO et al., 2007), mas sem conseguirem alcançar sucesso na fabricação e comercialização como iscas formicidas. Entretanto, diafentiuron apresenta-se como um promissor formicida, pois sua ação contra outros grupos de insetos e ácaros já é bastante conhecida (ISHAAYA et al., 2007). Além disso, por atuar na respiração celular (RUDER et al., 1991), seu modo de ação em insetos é semelhante ao da sulfluramida, que é o principal ingrediente ativo empregado em iscas tóxicas, com potencial para se tornar um bom formicida.

Diafentiuron é considerado um pré-inseticida que após o processo de fotólise é metabolizado em carbodiimida, se tornando um potente inseticida (RUDER;

KAYSER, 1993). Essa característica físico-química de diafentiuron pode ser manipulada em condições de laboratório e ser empregada para uso como ingrediente ativo de iscas formicidas, permitindo que as boas características desejadas em formicidas sejam manifestadas. Entretanto, não existem relatos na literatura de seu uso em iscas tóxicas, visando o controle químico de formigas-cortadeiras.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diafentiuron como um formicida, após o processo de fotólise em condições de laboratório e adicionado em formulação de isca tóxica, sendo oferecido a colônias de *A. sexdens rubropilosa*.

4.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido em colônias jovens (8 meses de idade) da criação do Laboratório de Insetos Sociais-Pragas (Lisp), localizado na FCA/UNESP, Botucatu, SP. As colônias foram mantidas sob condições climáticas controladas ($24^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar de $70\% \pm 5$) e em recipientes plásticos com capacidade de 395 mL de volume para a câmara de fungo e 250 mL para as câmaras de lixo e forrageamento.

Na câmara de fungo foi depositada uma camada de 1,5 cm de gesso na base (manutenção da umidade). Essas colônias receberam substrato vegetal a partir de folhas colhidas de plantas de *Acalypha* sp. (Euphorbiaceae), sendo oferecidas em estado natural (turgidas) ou desidratadas, conforme as condições de umidade da colônia.

As iscas aplicadas nas colônias de *A. sexdens rubropilosa* continham os seguintes tratamentos: 1- controle (sem ativo); 2- sulfluramida (formicida padrão); 3- diafentiuron (sem exposição à luz ultravioleta); 4- diafentiuron [2h de exposição à luz ultravioleta (UV)] e; 5- diafentiuron [6h de exposição à luz ultravioleta (UV)]. Dessa forma, prepararam-se somente quatro composições de iscas: controle (sem ativo), diafentiuron, diafentiuron (2h de luz) e diafentiuron (6h de luz). Para o tratamento contendo o ingrediente ativo sulfluramida foi utilizado o produto comercial na formulação granulada com 0,3% de ativo (Mirex-s[®]). Tratamentos contendo diafentiuron foram utilizados na concentração de 1% de ativo.

Sendo assim, as iscas produzidas no laboratório (exceto o formicida padrão) continham os seguintes ingredientes: óleo vegetal de soja (5%), polpa cítrica desidratada (94%) e ingrediente ativo (1%) (exceto controle), além de água destilada, que serviu apenas para oferecer a consistência desejada à formação do *pellet*. Antes da mistura, os tratamentos diafentiuron (2h) e diafentiuron (6h) de luz UV foram submetidos a uma etapa prévia de preparação com 24 horas de antecedência. Nesta etapa, o diafentiuron foi misturado numa solução de acetona + água destilada (proporção de 3:1) que em seguida foi exposta à luz ultravioleta com pico de 253nm de comprimento de onda (TUV-30W T8, Philips Electronics Brasil[®]) (adaptado e modificado de KEUM et al., 2002) durante o período determinado para cada um dos dois tratamentos (2h e 6h). Permaneceram, então, em ausência de luz até o período de 24 horas, para que ocorresse a reação química de decomposição em formas bioativas como, por exemplo, a carbodiimida.

Foram aplicadas 0,5g de iscas por colônia com o comprimento de 0,5 cm de *pellet* resultando, em média, 22 *pellets* por colônia. As iscas foram oferecidas na câmara de forrageamento uma única vez, onde foi possível avaliar o carregamento e a incorporação das mesmas. Utilizou-se uma escala de notas (0 a 4) (Figura 1) para avaliar o corte de folhas de *Acalypha* sp. pelas operárias após o tratamento com iscas aos 2, 7, 14 e 21 DAA (dias após aplicação). Essa escala foi elaborada com base na amostragem média de folhas de *Acalypha* sp. oferecida diariamente (1 folha inteira de tamanho médio para cada colônia), após análise de área foliar por meio do equipamento LI-COR[®] BIOSCIENCES (LI-3100C AREA METER).

Também foram realizadas pesagens das câmaras de fungo (fungo + adultos + prole) após o período de 21 dias de avaliação, extraindo-se a massa (g) dos recipientes plásticos contendo gesso para observar se houve crescimento da cultura de fungo.

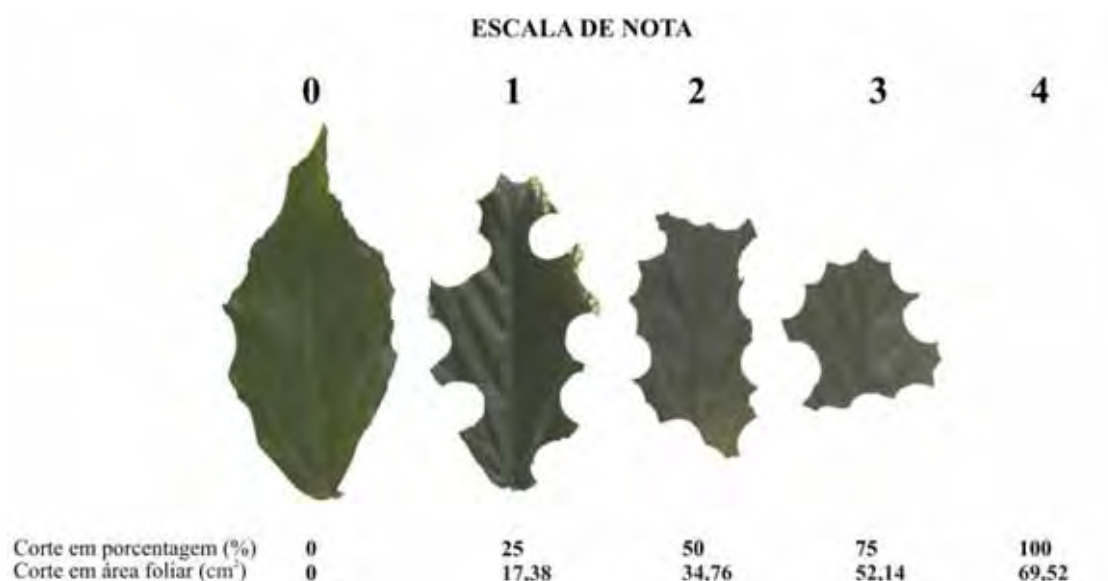


Figura 1. Ilustração e descrição da escala de notas no corte de folhas de *Acalypha* sp. por operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (iscas) e cinco repetições, sendo as parcelas constituídas de uma colônia. Para avaliar o corte de folhas de *Acalypha* sp. (escala de notas) fez-se um arranjo fatorial (5x4), onde o primeiro fator foi o grupo de tratamentos com as iscas e o segundo fator os dias após aplicação das iscas (DAA), comparando-se as médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Para o crescimento da cultura de fungo (massa), realizou-se análise de variância com comparação de médias dos tratamentos com iscas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Nestas análises também foi efetuado o teste de Shapiro-Wilk ($P < 0,05$), aceitando-se a normalidade dos dados. Utilizou-se o programa Sisvar versão 5.3 para as análises estatísticas. Os dados de carregamento e incorporação dos *pellets* foram avaliados em porcentagem, elaborando-se gráficos pelo Microsoft Office Excel 2007®.

4.3 Resultados

Apesar das colônias selecionadas serem jovens, estas exibiam atividade de forrageamento bem expressiva durante o período de criação nas condições de

laboratório. Entretanto, essa normalidade comportamental na tarefa de forragear foi contínua em todos os tratamentos até aos dois dias de avaliação após aplicação das iscas, quando se iniciou a análise do carregamento de folhas, conforme apresentado na Figura 2.

No entanto, após sete dias de avaliação da aplicação, somente as colônias que receberam o tratamento controle continuaram carregando de forma semelhante ao apresentado antes da aplicação das iscas. Após esse mesmo período, os tratamentos contendo diafenthiuron que foram expostos à luz UV já apresentavam redução no carregamento de folhas.

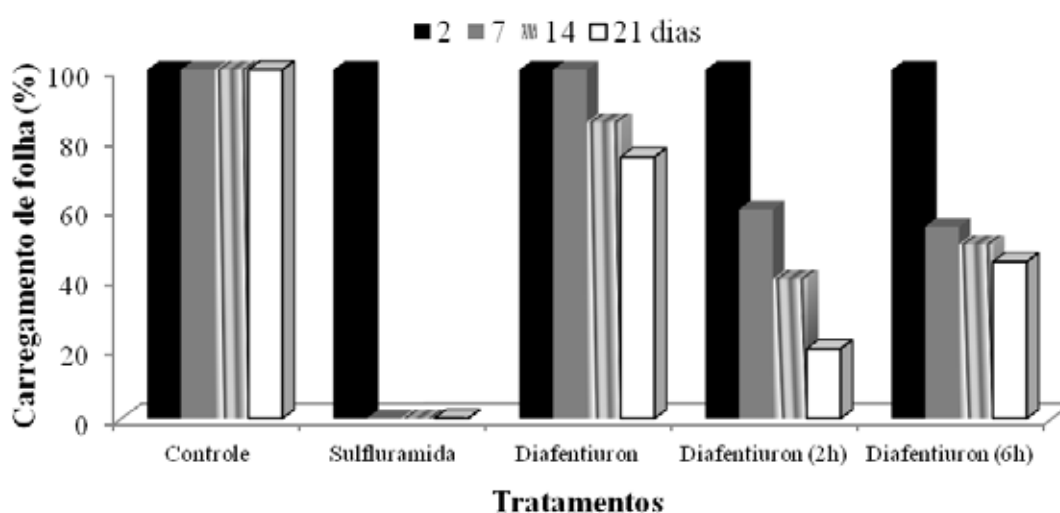


Figura 2. Carregamento de folhas de *Acalypha* sp. da câmara de forrageamento das colônias por operárias de *Atta sexdens rubropilosa* após aplicação dos tratamentos.

O carregamento foi tão reduzido nestes tratamentos, que diafenthiuron (2h de luz UV), por exemplo, apresentou média de 20% de carregamento de folhas aos 21 DAA. Por outro lado, com o tratamento contendo sulfluramida (isca comercial) as operárias não realizaram carregamento de folhas decorridos dois dias da aplicação, pois as colônias já apresentavam sintomas visíveis da ação desse ingrediente ativo sobre as operárias, diminuindo ou até cessando a execução dessa tarefa.

Na incorporação de substrato vegetal, que é uma tarefa realizada após o carregamento e manipulação do material forrageado, as operárias praticamente incorporaram todo o substrato carregado, exceto para o tratamento sulfluramida, onde ocorreu mortalidade

de operárias e, no tratamento diafentiuron (2h de luz UV) que apresentou a média de 55% de incorporação de folhas aos 21 dias após aplicação das iscas (Figura 3). Os demais tratamentos apresentaram porcentagem acima de 90%, principalmente no tratamento controle, que foi de 100%, ou seja, todas as folhas carregadas foram incorporadas.

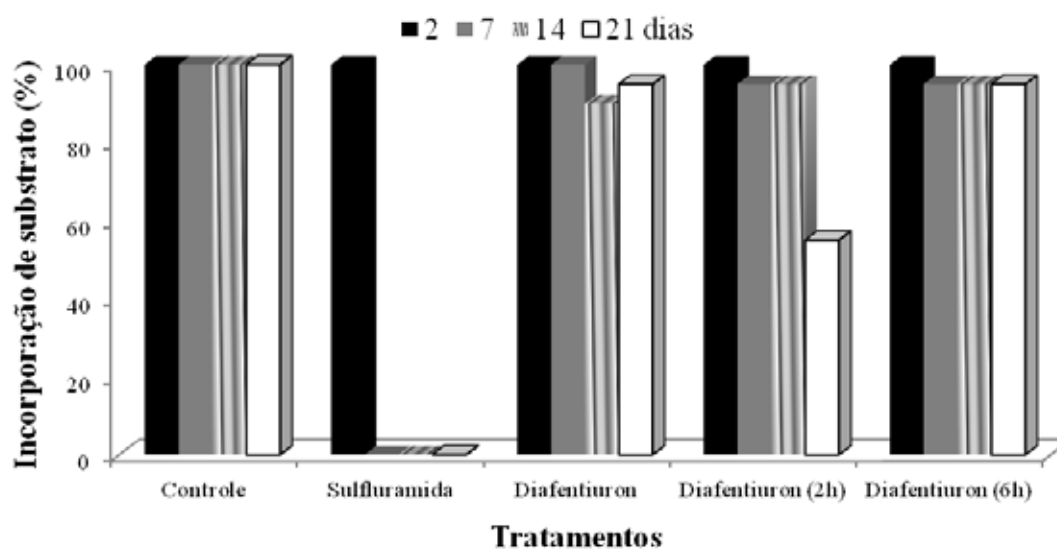


Figura 3. Incorporação de substrato vegetal na cultura de fungo por operárias de *Atta sexdens rubropilosa* após aplicação dos tratamentos.

Na avaliação da escala de notas no corte de folhas de *Acalypha* sp. pelas forrageiras ($F=115,94$; $P=0,0001$) (Tabela 1), o tratamento controle obteve a maior nota seguido do tratamento diafentiuron (sem exposição à luz). Os tratamentos com diafentiuron expostos à luz UV alcançaram notas intermediárias dentro dessa escala, pois as operárias chegavam a realizar o corte, mas carregavam poucos fragmentos recortados para a câmara de fungo. Por outro lado, o efeito do tratamento com sulfluramida não permitiu que as operárias realizassem o corte de folhas, obtendo-se a nota de valor zero (ausência de corte de folhas). Essa nota refere-se a paralisação da execução da tarefa, pois as formigas deixavam de realizá-la após o contato com as iscas que continham esse ingrediente ativo.

Tabela 1. Notas atribuídas ao corte de folhas de *Acalypha* sp. por operárias de *Atta sexdens rubropilosa* após aplicação dos tratamentos.

Tratamento	Nota de corte de folhas (média ± erro padrão) *
Controle	3,80 ± 0,09 c
Sulfluramida	0,00 ± 0,00 a
Diafentiuron	3,40 ± 0,20 c
Diafentiuron (2h)	2,15 ± 0,32 b
Diafentiuron (6h)	2,15 ± 0,15 b
CV (%)	11,04
Média geral	2,30

*Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Entretanto, essa média da escala de notas do corte de folhas (Tabela 1) foi obtida sem levar em consideração o espaço de tempo para observar o comportamento de corte, pois as operárias podem reduzir, manter ou aumentar essa tarefa durante determinado espaço de tempo estando sob o efeito de IA's. Desta forma, fez-se uma avaliação do corte de folhas com base na interação significativa entre os tratamentos (iscas) e DAA (F=3,39; P=0,0005) desdobrando-se os tratamentos dentro de cada dia, usando-se a escala de notas em um período de tempo com espaço de sete dias de avaliação até o 21º dia (Tabela 2).

Assim, as colônias do tratamento controle mantiveram a média próxima do valor quatro em todos os períodos de tempo avaliado após aplicação de iscas. Colônias do tratamento diafentiuron iniciaram o corte de folhas com média de nota semelhante ao tratamento controle, mas decresceram com o aumento do tempo de avaliação. Entre os tratamentos com o ingrediente ativo diafentiuron, aquele exposto às 2h de luz UV foi quem teve o decréscimo mais acentuado. Apesar dos tratamentos com diafentiuron (2 e 6h de exposição à luz UV) apresentarem essas médias de notas ao longo do período avaliado, sua média geral foi semelhante ao que representa uma média de corte de 50% (área média de 34,76 cm²) da folha de *Acalypha* sp. (Figura 1).

Tabela 2. Evolução dos tratamentos de acordo com o período de avaliação após aplicação de iscas, utilizando a escala de nota de corte de folhas de *Acalypha* sp. (0 a 4) por operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

Tratamento	Dias após aplicação (média ± erro padrão) *			
	2	7	14	21
Controle	3,80 ± 0,20 cA	3,80 ± 0,20 dA	3,60 ± 0,24 dA	4,00 ± 0,00 cA
Sulfluramida	0,00 ± 0,00 aA	0,00 ± 0,00 aA	0,00 ± 0,00 aA	0,00 ± 0,00 aA
Diafentiuron	3,80 ± 0,20 cA	3,40 ± 0,40 cdA	3,40 ± 0,24 cdA	3,00 ± 0,00 bcA
Diafentiuron (2h)	3,80 ± 0,20 cC	2,40 ± 0,60 bcB	1,60 ± 0,24 bAB	0,80 ± 0,37 aA
Diafentiuron (6h)	2,04 ± 0,24 bA	2,00 ± 0,32 bA	2,20 ± 0,37 bcA	2,00 ± 0,32 bA

*Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Para avaliar o desenvolvimento generalizado da colônia, fez-se uma análise de crescimento baseada na massa do conteúdo de toda a câmara de fungo (F=25,75; P=0,0001), levando-se em consideração a massa do jardim de fungo sem retirar os indivíduos da colônia (rainha, operárias e a prole) (Tabela 3). Após 21 dias de aplicação das iscas contendo os tratamentos, a massa da câmara de fungo de *A. sexdens rubropilosa* foi maior no tratamento controle devido à ausência de ativo, seguido dos tratamentos com diafentiuron, diafentiuron (2h) e diafentiuron (6h). O tratamento com sulfluramida não permitiu a realização desta avaliação após 21 dias devido à mortalidade ocorrida antes da finalização deste período.

Além das variáveis que puderam ser ponderadas para a realização de uma análise quantitativa neste experimento, também se fez observações de variáveis de difícil quantificação por conta do número e movimentação das operárias e o envolvimento de outros métodos que provocariam a perturbação das colônias e, assim, mascarar o efeito do tratamento ou coibir outras avaliações. Mas, essas variáveis auxiliam e contribuem na observação do estado de sanidade das mesmas depois de serem tratadas com formicidas.

Tabela 3. Massa da câmara de fungo de colônias jovens (8 meses) de *Atta sexdens rubropilosa* após 21 dias da aplicação de tratamentos.

Tratamentos	Jardim de fungo + adultos + prole (g)
	(média ± erro padrão) *
Controle	30,38 ± 1,46 c
Diafentiuron	26,00 ± 1,22 b
Diafentiuron (2h)	22,85 ± 0,24 b
Diafentiuron (6h)	17,35 ± 0,97 a
CV (%)	10,00
Média geral	24,14

*Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Aspectos da intoxicação de operárias (que representa a manifestação de sintomas), da presença de formigas mortas (principalmente na câmara de fungo quando não conseguem se deslocar para o lixo, por concentrar a manipulação de iscas pelas operárias), do crescimento de fungo contaminante (principalmente, *Escovopsis* sp.) e da sobrevivência da colônia ao final do período avaliado constam na Tabela 4. Em suma, somente se observou o efeito das iscas sob o estado das colônias de *A. sexdens rubropilosa* quando estas continham o IA sulfluramida.

Essa observação foi notória neste tratamento em todas as variáveis que foram citadas, porém, as iscas aplicadas nas colônias com diafentiuron, diafentiuron (2h) e diafentiuron (6h) apresentaram alguma mudança de estado no tocante à intoxicação de operárias, pois houve um princípio de paralisação dos movimentos, o que diminuiu a mobilidade nos primeiros dias após a aplicação, mas que de alguma forma, conseguiram retomar a mobilidade sem afetar a sobrevivência da colônia, apesar de provocar um pequeno abalo no seu estado natural de desenvolvimento nas condições de laboratório.

Tabela 4. Estado geral das colônias de *Atta sexdens rubropilosa* após o tratamento com iscas.

Tratamento	Estado das colônias			
	Intoxicação de operárias	Formigas mortas	Crescimento de fungo contaminante	Colônia morta
Controle	Não ocorreu	Mortalidade natural	Não ocorreu	Não ocorreu
Sulfluramida	Ocorreu em até 24 horas	Em todas as câmaras	Ocorreu a partir do terceiro DAA ¹	Ocorreu a partir do quinto DAA
Diafentiuron	Ocorrência nos primeiros DAA	Mortalidade natural	Não ocorreu	Não ocorreu
Diafentiuron (2h)	Ocorrência nos primeiros DAA	Mortalidade natural	Não ocorreu	Não ocorreu
Diafentiuron (6h)	Ocorrência nos primeiros DAA	Mortalidade natural	Não ocorreu	Não ocorreu

¹DAA: dias após aplicação.

4.4 Discussão

Fazendo-se uma análise generalizada da eficiência de diafentiuron como formicida pode-se aferir alguns questionamentos antes de avaliar seu real efeito sobre colônias de *A. sexdens rubropilosa*: a isca estava atrativa? As colônias estavam constantemente forrageando? Um dos problemas que afetaria a eficiência seria o ingrediente que irá conferir na formulação do formicida a ação atrativa, pois sua função é primordial para provocar o contato e ingestão com o ingrediente ativo e assim, permitir a contaminação pelo inseticida. Entretanto, após aplicação das iscas foi possível observar que o carregamento de iscas pelas operárias das colônias foi de 100% em até 1 hora de exposição das mesmas, comprovando a atratividade da polpa cítrica, que já é reconhecida (BRUGGER et al., 2008).

Outro problema é a atividade das colônias antes da experimentação, ou seja, durante a etapa de criação, pois de acordo com Delabie et al. (2000), é importante

certificar-se que formigueiros que serão utilizados em experimentos para testes de atratividade estejam ativos. Estes devem apresentar bom carregamento de folhas e possuir operárias de tamanho grande (largura de cabeça maior que 2 mm). Apesar de algumas dessas etapas serem determinadas para experimentação em campo, devem também ser seguidas em laboratório (FORTI et al., 1994), pois podem mascarar a eficiência de formicidas promissores.

Sendo assim, esses questionamentos podem ser eliminados, pois todas as colônias realizaram o carregamento de forma eficiente e não devolveram as iscas, nem na câmara de lixo e nem na câmara de forrageamento, em observação realizada após 24 horas da aplicação. Apesar de serem colônias jovens (aproximadamente 400 mL de fungo), as mesmas conseguiram carregar e incorporar todas as iscas que foram oferecidas e isto significa que as operárias foram capazes de carregar toda a quantidade de produto, possibilitando o aumento da probabilidade das formigas se contaminarem devido ao processo de incorporação (ANDRADE et al., 2002) e provocar a mortalidade das colônias.

Com a constatação da aceitação das iscas também pode-se propor que além das operárias carregarem, também aproveitaram o material, realizando as tarefas de preparo do substrato (iscas e posteriormente as folhas de *Acalypha* sp.) para incorporarem no jardim de fungo. Estas situações de verificação também são etapas do protocolo sugerido por Forti et al. (1994) e Delabie et al. (2000), os quais dão subsídios para se obter resultados confiáveis e rápidos.

Pela Figura 2, fica evidente a situação das colônias após receberem as iscas, principalmente com sulfuramida, pois o tratamento controle manteve 100% do carregamento de folhas até o fim do período de avaliação. O uso de sulfluramida como formicida devido as suas características químicas já é bastante conhecido (ZANETTI et al., 2003c, 2004; NAGAMOTO et al., 2004), por isso, foi utilizado como padrão para certificar que era possível ocorrer mortalidade das colônias e que o método adotado favoreceria esta condição de toxicidade.

Ainda na Figura 2, os tratamentos contendo diafentiuron diminuíram o carregamento de folhas, chegando a somente 20% quando tratado com diafentiuron (2h). Neste caso, será que poderia haver uma simples rejeição das folhas de *Acalypha* sp. após aplicação das iscas devido a seleção? Isto dificilmente seria possível, pois desde o início da criação vem sendo oferecido, cortado e carregado o mesmo substrato, impedindo o

confundimento no momento da seleção devido ao condicionamento das operárias forrageiras e escoteiras a permanecerem com este odor, tornando-se um sinal característico do substrato, conforme mencionado por Brugger et al. (2008).

Além disso, ao analisar o carregamento e a média da nota do corte de folhas (Tabela 1), reforça-se a hipótese de que, se houve uma pausa nessas duas tarefas (corte e carregamento de folhas) poderá ser entendida como uma situação que não foi provocada pela seleção do substrato, mas sim, por questões internas da colônia como, por exemplo, a necessidade ou não de folhas para incorporação no jardim de fungo ou até mesmo a economia de energia pelas operárias, priorizando outras tarefas de relevante importância ou pela ação do ingrediente ativo diafentiuron que foi submetido à luz UV.

Pela observação a Figura 1, juntamente com a Tabela 1, pode-se fazer uma simples estimativa da quantidade média de folhas de *Acalypha* sp. que poderia ser consumida pelas colônias de *A. sexdens rubropilosa* após o período de avaliação (21 DAA). Nessa estimativa, o tratamento controle ficaria com 1386,92 cm², diafentiuron com 1240,93 cm² e diafentiuron (2h) e (6h) com 784,70 cm², respectivamente. Por esta estimativa, as colônias que receberam diafentiuron submetido à luz UV teriam uma redução de corte (21 DAA) de até 54,41% a menos do que o tratamento controle, permitindo sugeri-lo como um promissor formicida, mas que necessita de investigações mais profundas.

Assim como a sulfluramida, que possui o mecanismo de ação na respiração celular na síntese de ATP (*adenosine triphosphate*) mitocondrial, o diafentiuron também age neste mesmo sítio nos insetos e ácaros (RUDER; KAYSER, 1993), o que poderia ser mais acentuado quando submetido à luz UV, porque diafentiuron é um pré-inseticida, necessitando se transformar em um metabólito secundário como o carbodiimida, por exemplo, para tornar-se um potente inseticida (RUDER et al., 1991). Desta forma, seria possível que as formigas depois de alguns DAA não conseguissem realizar a tarefa de cortar e carregar, o que poderia implicar em consequências negativas para o desenvolvimento da colônia.

Umas dessas consequências negativas poderia ser o decréscimo do jardim de fungo das colônias, reduzindo a fonte de alimento e diminuindo as chances de sobrevivência. Assim, na análise da variável massa da câmara de fungo, verifica-se que as colônias que receberam diafentiuron ficaram com as últimas colocações, comprovando o efeito desse ingrediente ativo sobre colônias de *A. sexdens rubropilosa*. Entretanto, esse efeito

não foi suficiente para provocar a mortalidade das colônias tratadas com diafentiuron (Tabela 4), pois ao final do período avaliado (21 DAA) as colônias ainda permaneciam vivas, mas com notória redução no corte de folhas de *Acalypha* sp.

Na observação do estado das colônias após o tratamento com iscas (Tabela 4) foi possível perceber que o diafentiuron obteve uma reação de intoxicação de operárias semelhantes ao de sulfluramida durante os primeiros DAA, mas esta reação pode ter sido revertida possivelmente pela baixa concentração que foi aplicada (1%) e/ou por alguma reação metabólica de desintoxicação das operárias ou até pela insuficiência de degradação de diafentiuron, podendo se transformar em outro composto (por exemplo, hidroxidiafentiuron ou ureia) que não seria tão tóxico quanto seu metabólito carbodiimida (KAYSER; EILINGER, 2001). Essa capacidade de diafentiuron se metabolizar em outros compostos não tóxicos para insetos devido a sua dependência por ativação de enzimas é que o torna seletivo para alguns grupos de insetos.

Isto permitiria o retorno das atividades de corte, mas com baixa eficiência, o que pode ser comprovado pelos resultados da média da nota de corte de folhas de *Acalypha* sp. e da massa do jardim de fungo, mas que não foi suficiente para causar a mortalidade da colônia. Determinar a dosagem precisa para causar a ação retardada do ingrediente ativo necessita de uma metodologia exclusiva para isto (NAGAMOTO et al., 2004).

Esses mesmos autores explicam que operárias de *A. sexdens rubropilosa* apresentam dificuldade de desintoxicação de sulfluramida e fipronil, o que favoreceria sua eficiência sobre as colônias em vantagem sobre diafentiuron que possui o modo de ação similar ao de sulfluramida, mas que não provocou o efeito tóxico esperado para esta espécie. Além disso, Forti et al. (1998) sugeriram que possivelmente o jardim de fungo de formigas-cortadeiras pode colaborar na desintoxicação de alguns ingredientes ativos, o que as diferem de outras espécies de insetos.

4.5 Conclusão

O ingrediente ativo sulfluramida demonstrou seu comprovado efeito formicida, matando as colônias que receberam este tratamento. Diafentiuron com 2h de exposição à luz UV provocou significativa redução no carregamento e incorporação de folhas, além de alcançar menores valores na escala de corte de folhas e diafentiuron com 6h de luz UV reduziu a massa de jardim de fungo, indicando que o processo de fotólise de diafentiuron pode ser planejado para seu uso em isca formicida, entretanto, necessita-se de mais investigações (diferentes concentrações, por exemplo) para torná-lo mais eficiente, pois não conseguiu matar as colônias de *A. sexdens rubropilosa*.

4 CONCLUSÕES

- Houve prevalência do fungo *L. gongylophorus* entre os fungos filamentosos inoculados em placas após aplicação dos formicidas, mostrando que nem sempre se pode afirmar que ocorre sinergismo de ingrediente ativo formicida e fungos associados de *A. sexdens rubropilosa*.
- O ingrediente ativo diafentiuron se apresentou promissor, podendo ser mais eficiente se for permitido algum processo de bioativação de seu metabólito carbodiimida. Os ingredientes ativos indoxacarbe e imidaclopride apresentaram baixa dose média letal e baixo tempo médio letal, tornando-se promissores formicidas por ação de contato para operárias de *A. sexdens rubropilosa*.
- O oferecimento de isca pastosa contendo diafentiuron após ser submetido ao processo de fotólise à luz UV, provoca mortalidade de operárias de *A. sexdens rubropilosa* acima de 80% entre o terceiro e quinto dia após aplicação do ingrediente ativo.
- Diafentiuron com 2h de exposição à luz UV provocou significativa redução no carregamento e incorporação de folhas, indicando que o processo de fotólise pode ser planejado para seu uso em isca formicida, mas precisa de mais investigações para torná-lo eficiente, pois não conseguiu matar as colônias de *A. sexdens rubropilosa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 18, n. 1, p. 265-267, 1925.

ALVES, S. B.; SOSA GOMEZ, D. R. Virulência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel., 1908). **Poliagro**, Bandeirantes, v. 5, n. 1, p. 1-9, 1983.

AMANTE, E. A formiga saúva *Atta capiguara*, praga das pastagens. **O Biológico**, Campinas, v. 33, p. 113-120, 1967.

AMANTE, E. **Influência de alguns fatores microclimáticos sobre a formiga saúva *Atta laevigata* (F. Smith, 1858), *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, *Atta bisphaerica* Forel, 1908 e *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera, Formicidae), em formigueiros localizados no estado de São Paulo.** 1972. 175f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.

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**, Chico, v. 40, n. 2, p. 293-306, 2002.

ANJOS, N.; DELLA LUCIA, T. M. C.; MAYHÉ-NUNES, A. J. **Guia prático sobre formigas cortadeiras em reflorestamento.** Ponte Nova, MG: Graff Cor, 1998, 100 p.

ARAÚJO JR, M. V. **Efeito da fragmentação florestal nas taxas de herbivoria da formiga cortadeira *Atta cephalotes***. 2004. 51f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 2007, 380p.

BARR, C. L. Fire ant mound and foraging suppression by indoxacarb bait. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, Mount Pleasant, v. 20, n. 3, p. 143-150, 2003.

BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungus garden structure in the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Formicidae, Attini). **Symbiosis**, Dordrecht, v. 21, p. 9-24, 1996.

BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, Botucatu, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.

BOT, A. N. M. et al. Waste management in leaf-cutting ants. **Ethology Ecology e Evolution**, Oxfordshire, v. 13, n. 3, p. 225-237, 2001.

BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A.; SANHUDO, C. E. D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Editora). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2011, 421p.

BRUGGER, M. S. et al. Avaliação dos efeitos tóxicos de extrato hexânico de *Azadirachta indica* (A. Juss) em colônias de *Acromyrmex rugosus* (Smith, 1858) (Formicidae, Attini). **Revista Brasileira de Zoociências**, Juiz de Fora, v. 10, n. 3, p. 233-238, 2008.

BUENO, O. C.; BUENO, F. C. Plantas inseticidas: perspectivas de uso no controle de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Editora). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011, 421p.

CAMARGO, R. S. et al. Post-selection and return of foraged material by *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 42, n. 1, p. 93-102, 2003.

CARLOS, A. A. et al. Filamentous fungi found in *Atta sexdens rubropilosa* colonies after treatment with different toxic bait formulations. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 135, n. 4, p. 326-331, 2011.

CARREIRO, S. C. et al. *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1891-1894, 2004.

CHONG, K-F.; LEE, C-Y. Evaluation of liquid baits against field populations of the longlegged ant (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 4, p. 1586-1590, 2009.

CLOYD, R. A.; BETHKE, J. Impact of neonicotinoid insecticides on natural enemies in greenhouse and interiorscape environments. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 67, p. 3-9, 2011.

COLE, L. M.; NICHOLSON, R. A.; CASIDA, J. E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 46, p. 47-54, 1993.

CURRIE, C. R. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 357-380, 2001a.

CURRIE, C. R. et al. Ancient tripartite co-evolution in the *Attini* ant-microbe symbiosis. **Science**, Washington-DC, v. 299, p. 386-388, 2003.

CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**, Heidelberg, v. 128, p. 99-106, 2001b.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington-DC, v. 96, p. 7998-8002, 1999.

DEKEYSER, M. A. Acaricide mode of action. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 61, p. 103-110, 2005.

DELABIE, J. H. C.; DELLA LUCIA, T.; PASTRE, L. Protocolo de experimentação para avaliar a atratividade de novas formulações de iscas granuladas utilizadas no controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex* spp. e *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini) no campo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 843-848, 2000.

DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011, 421 p.

DELLA LUCIA, T. M. C.; ARAUJO, M. S. Formigas cortadeiras: atualidades no combate. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado: doenças, pragas e plantas daninhas**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2000, 416 p.

DELLA LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G.; MOREIRA, D. D. O. Espécies de formigas cortadeiras no Brasil. In: DELLA LUCCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 1993, 262 p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, London, v. 12, p. 13-15, 1990.

ELBERT, A. et al. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 64, p. 1099-1105, 2008.

FARJI-BRENER, A. G.; ILLES, A. E. Do leaf-cutting ant nests make “bottom-up” gaps in neotropical rain forest? A critical review of the evidence. **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, p. 219-227, 2000.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3rd Edition. Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1971, 333 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**, Chico, v. 50, n. 3, p. 1-15, 2007.

FORTI, L. C. et al. Eficiencia de sulfluramida, fipronil y clorpirifos como sebos en el control de *Atta capiguara* Gonçalves (Hymenoptera: Formicidae). **Pasturas Tropicales**, Cali, v. 25, n. 3, p. 28-35, 2003.

FORTI, L. C. et al. Trajectory of water- and fat-soluble dyes in the grass-cutting ant *Atta capiguara*: evaluation of infrabuccal cavity, post-pharyngeal glands and gaster (Hymenoptera, Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 59, p. 1-10, 2012.

FORTI, L. C.; NAGAMOTO, N. S.; PRETTO, D. R. Controle de formigas cortadeiras com isca granulada. In: SIMPÓSIO SOBRE FORMIGAS CORTADEIRAS DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 113-132.

FORTI, L. C.; PRETTO, D. R.; GARCIA, I. P. Aprimoramento de metodologias experimentais para controle de formigas cortadeiras. In: CURSO DE ATUALIZAÇÃO NO CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS, 1994, Botucatu. **Anais...** Botucatu: PCMIP/IPEF, 1994, p. 14-23.

FOWLER, H. G.; STILES, E. W. Conservative resource management by leaf-cutting ants? The role of foraging territories and trails and environmental patchiness. **Sociobiology**, Chico, v. 5, p. 24-41, 1980.

GROSMAN, D. M. et al. Attractiveness and efficacy of fipronil and sulfluramid baits for control of the Texas leaf cutting ant (*Atta texana* (Buckley) (Hymenoptera; Formicidae)). **Southwestern Entomologist**, Dallas, v. 27, n. 3-4, p. 251-256, 2002.

HERNANDEZ, J. V.; JAFFÉ, K. Dano econômico causado por populações de formigas *Atta laevigata* (F. Smith) em plantações de *Pinus caribaea* Mor. e elementos para o manejo da praga. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 287-298, 1995.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990, 733 p.

ISHAAYA, I. et al. Insecticides with novel modes of action: mechanism, selectivity and cross-resistance. **Entomological Research**, Seul, v. 37, p. 148-152, 2007.

JACCOUD, D. B.; HUGHES, W. O. H.; JACKSON, C. W. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 93, p. 51-61, 1999.

JACOB, L. **Seleção de ingredientes ativos para o controle de formigas urbanas**. 2002. 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2002.

KADIR, H. A.; KNOWLES, C. O. Octopaminergic action of the carbodiimide metabolite of diafenthiuron. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 39, p. 261-269, 1991.

KAYSER, H.; EILINGER, P. Metabolism of diafenthiuron by microsomal oxidation: proclivity activation and inactivation as mechanisms contributing to selectivity. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 57, p. 975-980, 2001.

KEUM, Y-S. et al. Photodegradation of diafenthiuron in water. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 58, p. 496-502, 2002.

LARANJEIRO, A. J.; ZANUNCIO, J. C. Avaliação da isca à base de sulfluramida no controle de *Atta sexdens rubropilosa* pelo processo de dosagem única de aplicação. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**, Piracicaba, n. 48-49, p. 144-152, 1995.

LOUREIRO, E. S.; MONTEIRO, A. C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 553-561, 2005.

MARINHO, C.G.S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; PICANÇO, M. C. Fatores que dificultam o controle das formigas cortadeiras. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 7, n. 2, p. 18-21, 2006.

McCANN, S. F. et al. The discovery of indoxacarb: oxadiazines as a new class of pyrazoline-type insecticides. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 57, p. 153-164, 2001.

MENDES, T. D. et al. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**, Fukuoka-shi, v. 3, p. 228-245, 2012.

MICHELS, K. et al. Biological control of leaf-cutting ants using forage grasses: nest characteristics and fungus growth. **Journal Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 187, p. 259-267, 2001.

MIDDELHOVEN, W. J. et al. *Cryptococcus haglerorum*, sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leafcutting ant *Atta sexdens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 83, p. 167-174, 2003.

MOREIRA, A. A. et al. External and internal structure of *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae) nests. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 128, p. 204-211, 2004.

MUELLER, U. G. Ant versus fungus versus mutualism: Ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. **American Naturalist**, Chicago, v. 160. p. 67-98, 2002.

MUELLER, U. G.; GERARDO, N. Fungus-farming insects: multiple origins and diverse evolutionary histories. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington-DC, v. 99, n. 24, p. 15248-15249, 2002.

NAGAMOTO, N. S. **Estudos toxicológicos de princípios ativos utilizando como modelo *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae)**. 2003. 234f. Tese (Doutorado em Agronomia) Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.

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

NAGAMOTO, N. S. et al. Reavaliação do impacto do fungo parasita *Escovopsis*, em colônias de formigas cortadeiras, mantidas em laboratório. In: SIMPÓSIO DE MIRMECOLOGIA, 2003, Florianópolis, **Anais...** Florianópolis: UFSC, 2003, p. 184-186.

NAGAMOTO, N. S.; FORTI, L. C.; RAETANO, C. G. Evaluation of the adequacy of diflubenzuron and dechlorane in toxic baits for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) based on formicidal activity. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 80, p. 9-13, 2007.

NAKANO, O. Novos produtos visando o controle das saúvas. In: CURSO DE ATUALIZAÇÃO NO CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS, 3., 1994, Botucatu. **Anais...** Botucatu: IPEF, 1994, p. 24-27.

OLIVEIRA, M. A. et al. Manejo de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Editora). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011, 421p.

PARRA, J. R. P. et al. Determinação de temperatura e umidade relativa no interior de colônias de insetos sociais para estudos bioecológicos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 3, p. 20-33, 1974.

PETROSKE, E.; CASIDA, J. E. Diafenthiuron action: carbodiimide formation and ATPase inhibition. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 53, p. 60-74, 1995.

RAJABASKAR, D.; REGUPATHY, A. Persistence of diafenthiuron in Cardamom. **Pesticide Research Journal**, Jodhpur, v. 20, n. 2, p. 247-249, 2008.

REIS FILHO, W. et al. **Reconhecimento dos danos causados por formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em plantios iniciais de *Pinus taeda* no sul do Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 4 p. (Comunicado Técnico 189).

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

ROCES, F.; KLEINEIDAM, C. Humidity preference for fungus culturing by workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Insectes Sociaux**, Basel, v. 47, p. 348-350, 2000.

RODRIGUES, A. et al. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungus garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 96, p. 331-342, 2009.

RODRIGUES, A. et al. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, Secaucus, v. 56, p. 604-614, 2008.

RODRIGUES, A. et al. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, Dordrecht, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005.

RODRIGUES, A. **Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas.** 2004. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2004.

RUDER, F. J. et al. The thiourea insecticide/acaricide diafenthiuron has a novel mode of action: inhibition of mitochondrial respiration by its carbodiimide product. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 41, p. 207-219, 1991.

RUDER, F. J.; KAYSER, H. The carbodiimide product of diafenthiuron inhibits mitochondria *in vivo*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 46, p. 96-106, 1993.

SANTOS, A. V.; OLIVEIRA, B. L.; SAMUELS, R. I. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 163, p. 233-240, 2007.

SAS INSTITUTE. **Getting Started with the SAS Learning Edition.** Cary, NC: SAS Institute, 2002.

SILVA, A. et al. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, p. 307-313, 2003.

SILVA, A. et al. Susceptibility of ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.132, n. 2, p. 115-119, 2006.

SILVESTRE, R. **Estrutura de comunidades de formigas do cerrado.** 2000, 61f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

STANLEY, J. et al. Toxicity of diafenthiuron to honey bees in laboratory, semi-field and field conditions. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 66, p.505-510, 2010.

SU, N-Y.; SCHEFFRAHN, R. H. Laboratory evaluation of two slow-acting toxicants against Formosan and Eastern subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 84, n.1, p. 170-175, 1991.

SU, N-Y.; TOKORO, M.; SCHEFFRAHN, R. H. Estimating oral toxicity of slow-acting toxicants against subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 87, n. 2, p. 398-401, 1994.

SUCHAIL, S.; DEBRAUWER, L.; BELZUNCES, L. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 60, p. 291-296, 2003.

VANDER MEER, R. K.; LOFGREN, C. S.; WILLIAMS, D. F. Fluoroaliphatic sulfones: a new class of delayed-action insecticides for control of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 78, p. 1190-1197, 1985.

WANG, T. et al. Perspectives on the inclusion of perfluorooctane sulfonate into the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. **Environmental Science and Technology**, Dordrecht, v. 43, n.14, p. 5171-5175, 2009.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, p. 315-322, 1990.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, Heidelberg, v. 7, p. 143-156, 1980.

WING, K. D. et al. Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 19, p. 537-545, 2000.

ZANETTI, R. et al. Combate sistemático de formigas cortadeiras com iscas granuladas, em eucaliptais em cultivo mínimo. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 387-392, 2003a.

ZANETTI, R. et al. Eficiência de isca formicida aplicada sobre o monte de terra solta de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 410-407, 2003c.

ZANETTI, R. et al. Eficiência de iscas granuladas (sulfluramida 0,3%) no controle de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 878-882, 2004.

ZANETTI, R. et al. Level of economic damage for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in *Eucalyptus* Plantations in Brazil. **Sociobiology**, Chico, v.42, n.2, p. 433– 442, 2003b.

ZANUNCIO, J. C. et al. Eficiência da isca granulada Mirex-S (sulfluramida 0,3%) no controle da formiga cortadeira *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 17, n. 1, p.85-90, 1993.

ZANUNCIO, J. C. et al. Eficiência da isca granulada Mirex-S, à base de sulfluramida, no controle da formiga cortadeira *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 16, n. 3, p. 357-361, 1992.