UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AMANDA DE OLIVEIRA BARBOSA

TOXICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS PARA OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Rio Claro
2012

AMANDA DE OLIVEIRA BARBOSA

TOXICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS PARA OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Orientador: Odair Correa Bueno

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2012

595.796 Barbosa, Amanda de Oliveira
B238t Toxicidade de produtos naturais para operárias de Atta sexdens rubropilosa Forel (Hymenoptera: Formicidae) / Amanda de Oliveira Barbosa. - Rio Claro : [s.n.], 2012
58 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Odair Correa Bueno

1.Formiga. 2. Formigas cortadeiras. 3. Controle de pragas. 4. Magonia pubescens. 5. Duguetia lanceolata. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Aos meus amigos e à minha família

Dedico

AGRADECIMENTOS

- À Universidade Estadual Paulista, por ter me dado bases para que eu pudesse realizar o sonho de me tornar bióloga.

- Ao meu orientador Odair Correa Bueno, pelo incentivo e por toda ajuda que recebi ao longo do trabalho.

- À Vanessa Domingues, pesquisadora da Ufscar, sem a qual seria impossível realizar esta pesquisa.

- Aos meus pais, que me deram a oportunidade de estudar e por toda sua dedicação e carinho.

- Ao meu irmão Leonardo, por ser meu amigo e por me incentivar em horas difíceis.

- Ao meu querido Rafael, por estar sempre presente em minha vida e por todo o apoio, compreensão, paciência e carinho.

- Aos meus avós Joana e Frederico, por representarem tanto em minha vida e por fazerem o possível e o impossível por seus netos.

- À minha avó "Tica", por acreditar em mim e por ser uma companhia tão agradável.

- Às minhas amigas Marise e Juliana, por estarem comigo nos momentos de nervosismo, por me apoiarem incondicionalmente e sempre torcerem por mim.

- Às minhas amigas Tatiane, Laís e Flávia, que me acompanharam ao longo da graduação e com quem dividi os momentos alegres e os complicados da vida acadêmica.

- À Marcela e à Nathália, pelo companheirismo e por sempre me ajudarem em meus trabalhos no laboratório.

- Aos amigos do CEIS, que tornaram o ambiente do laboratório mais divertido.

- À minha turma CBN 2008 que, como todo grupo, teve seus momentos de desentendimento, mas que de alguma forma, sempre priorizou a união.

- À Maria Eugênia Vieira Conti (in memoriam), uma pessoa que transmitiu a todos que a vida é bela e que, por mais que existam problemas, eles sempre podem ser resolvidos.

- A todos que fazem parte da minha vida e que, direta ou indiretamente, estiveram presentes durante o meu amadurecimento, tanto como pessoa quanto como profissional.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – *Magonia pubescens*.....22
Figura 02 – *Duguetia lanceolata*.....24
Figura 03 – Formigueiro mantido no laboratório de formigas cortadeiras do Centro de Estudos de Insetos Sociais.....25
Figura 04 – Fluxograma para ilustrar como são feitas as partições dos extratos.....26
Figura 05 – Imagem ilustrando uma das placas de um bioensaio.....28
Figura 06 – Estufa para B.O.D. onde as formigas ficam armazenadas ao longo dos 25 dias do experimento.....29
Figura 07 – Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos brutos de *Magonia pubescens*.....33
Figura 08 – Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Magonia pubescens*.....34
Figura 09 – Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Duguetia lanceolata*.....35
Figura 10 – Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos foliares de *Duguetia lanceolata*.....37
Figura 11 – Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos dos ramos de *Duguetia lanceolata*.....38
Figura 12 – Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos das sementes de *Duguetia lanceolata*.....39
Figura 13 – Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos da casca do fruto de *Duguetia lanceolata*.....41
Figura 14 – Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os esteroides de *Duguetia lanceolata*.....42

Figura 15 – Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as subfrações hexano e diclorometano a,b e c dos extratos hexânicos foliares de *Duguetia lanceolata*.....43
Figura 16 – Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com subfrações dos extratos hexânicos foliares de *Duguetia lanceolata*.....44
Figura 17 – Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio tópico com óleo essencial de *Duguetia lanceolata*.....45

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Tabela que mostra as partições líquido-líquido de *Duguetia lanceolata*.....27
Tabela 02 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Magonia pubescens*.....33
Tabela 03 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Magonia pubescens*.....34
Tabela 04 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Duguetia lanceolata*.....36
Tabela 05 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos foliares de *Duguetia lanceolata*.....37
Tabela 06 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos dos ramos de *Duguetia lanceolata*.....38
Tabela 07 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos das sementes de *Duguetia lanceolata*.....40
Tabela 08 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos da casca do fruto de *Duguetia lanceolata*.....41
Tabela 09 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os esteroides de *Duguetia lanceolata*.....42
Tabela 10 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com subfrações dos extratos hexânicos foliares de *Duguetia lanceolata*.....44
Tabela 11 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio tópico com óleo essencial de *Duguetia lanceolata*.....45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO....11
2. REVISÃO AS LITERATURA....13
2.1. As formigas cortadeiras e o fungo simbionte....13
2.2. Seletividade de plantas pelas formigas cortadeiras....14
2.3. Biologia das Saúvas....15
2.4. Formigas cortadeiras como pragas....16
2.5. Controle das formigas cortadeiras....16
2.5.1. Controle mecânico....16
2.5.2. Controle cultural....17
2.5.3. Controle biológico....17
2.5.4. Controle químico....17
2.6. Plantas tóxicas às formigas cortadeiras ou ao fungo simbionte....19
2.7. Plantas utilizadas....21
2.7.1. *Magonia pubescens* (Tingui)....21
2.7.2. *Duguetia lanceolata* (Pindaíva)....23
3. MATERIAL E MÉTODOS....25
3.1. Origem das formigas....25
3.2. Extração das substâncias....26
3.3. Bioensaios de toxicidade de extratos....28
3.3.1. Dieta artificial....29
3.3.2. Tratamento por ingestão....30
3.3.3. Tratamento tópico....30
3.4. Análise dos dados....31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO....32
4.1. Toxicidade de *Magonia pubescens* para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*....32
4.1.1. Toxicidade de extratos brutos de *Magonia pubescens*....32
4.1.2. Toxicidade de partições do caule de *Magonia pubescens*....33
4.2. Toxicidade de *Duguetia lanceolata* para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*....35
4.2.1. Toxicidade do extrato bruto de *Duguetia lanceolata*....35
4.2.2. Toxicidade de partições das folhas de *Duguetia lanceolata*....36
4.2.3. Toxicidade de partições dos ramos de *Duguetia lanceolata*....37

4.2.4. Toxicidade de partições das sementes de *Duguetia lanceolata*.....39
4.2.5. Toxicidade de partições da casca do fruto de *Duguetia lanceolata*.....40
4.2.6. Toxicidade de esteroides de *Duguetia lanceolata*.....41
4.2.7. Toxicidade de subfrações de *Duguetia lanceolata*.....43
4.2.8. Toxicidade de óleo essencial de *Duguetia lanceolata* (Bioensaio Tópico).....45
5. CONCLUSÕES.....48
6. RESUMO.....49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....50

1 INTRODUÇÃO

As formigas têm um papel importante nos ecossistemas da Terra, pois mantêm as condições químicas e físicas do solo, bem como a homeostase do ambiente, além de serem polinizadoras de plantas e dispersoras de sementes (BROWN Jr., 2000; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Porém, em determinados ambientes onde não há certo equilíbrio, elas podem se tornar pragas, prejudicando as atividades agrícolas e levando bactérias e outros micro-organismos de um lugar para outro.

As formigas cortadeiras pertencem à família Formicidae, subfamília Myrmicinae, tribo Attini. Os gêneros mais derivados, *Acromyrmex* (quenquéns) e *Atta* (saúvas), são herbívoros dominantes em muitos ecossistemas, além de ocuparem uma posição importante dentre as pragas agrícolas (WILSON, 1980). Elas possuem colônias bem desenvolvidas, polimorfismo funcional das operárias e, nas espécies de *Atta*, uma distinta casta de soldados (STRADLING, 1991).

As plantas, normalmente cortadas por formigas cortadeiras, são utilizadas como substrato para crescimento de um fungo simbionte, *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Möller), que serve de alimento para as larvas e adultos de formigas (HEBLING-BERALDO et al., 1991). Entretanto, já foi determinado que as operárias adultas de formigas cortadeiras também ingerem líquido proveniente dos tecidos das folhas cortadas para satisfazer alguns de seus requerimentos metabólicos (LITTLEDYKE e CHERRETT, 1975; QUINLAN e CHERRETT, 1979).

As saúvas são responsáveis por grandes danos econômicos em áreas agrícolas, devido ao grande tamanho dos sauveiros, que, por esse motivo, necessitam de um enorme volume de folhas para o cultivo do fungo (HOWARD, 1988). Há vários trabalhos que demonstram os danos causados pelas cortadeiras em áreas agrícolas e de pastagens, mas não há muitos relatos sobre os danos em áreas urbanas. Sabe-se, porém, que elas ocorrem em jardins, parques, hortas e na arborização das ruas (JUSTI Jr. et al., 1996).

Os prejuízos ocasionados por estas formigas são mencionados desde o século XVI, mas as medidas de controle são ainda insuficientes (MARICONI, 1970). Além disso, todas as

formas de controle apresentam custos elevados, efeitos temporários e, muitas vezes, causam danos ao ambiente (WILLIAMS, 1990).

O controle químico de pragas de plantas cultivadas constitui-se uma das principais preocupações ecológicas, devido aos efeitos maléficos causados pelos agrotóxicos, sobre o ambiente, o homem e outros animais. Como consequência deste fato, nos últimos anos tem aumentado a pesquisa na busca de alternativas para o controle de insetos pragas. Uma delas é utilizar produtos que possam substituir estes agrotóxicos por outros com degradação rápida, que sejam mais específicos e que causem, portanto, menos danos ao ambiente.

O Centro de Estudos de Insetos Sociais da UNESP de Rio Claro, em colaboração com pesquisadores do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, vêm desenvolvendo, há algum tempo, estudos que utilizam plantas indicadas pelo conhecimento popular para o controle de formigas cortadeiras.

O objetivo do trabalho foi verificar os efeitos tóxicos de alguns produtos ativos naturais sobre as formigas cortadeiras pertencentes à subespécie *Atta sexdens rubropilosa*, com o intuito de encontrar um método eficiente de controle, mas que não seja tão prejudicial para a flora e a fauna.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 As formigas cortadeiras e o fungo simbionte

As formigas pertencentes à família Formicidae, subfamília Myrmicinae, tribo Attini caracterizam-se por serem simbiontes obrigatórias do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Möller), que é a principal fonte de alimento das larvas, além de ser parte da alimentação dos adultos (QUINLAN e CHERRETT, 1979; MUELLER, 2002). Elas compreendem cerca de 215 espécies dentro de 13 gêneros (BROWN Jr., 2000; BRANDÃO e MAYHÉ-NUNES, 2001) e *Atta* e *Acromyrmex* representam as formigas cortadeiras de folhas que cultivam seu fungo predominantemente sobre fragmentos frescos de origem vegetal (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

A simbiose existente entre o fungo e as formigas é benéfico para ambos (SCHULTZ et al., 2005) e pode ser percebida entre os custos e benefícios desta relação: as formigas são beneficiadas pela quebra de enzimas que possibilitam a detoxicação de compostos secundários provenientes dos vegetais e que poderiam atuar como inseticidas (LITTLEDYKE & CHERRETT, 1978; NORTH et al., 1997, 1999); por outro lado, o fungo se beneficia pelo ambiente livre de competidores, já que as formigas produzem compostos antibióticos (CURRIE e STUART, 2001). Assim, existe uma relação de interdependência entre as formigas e o fungo, na qual a ausência de um acarretaria no desaparecimento do outro (CURRIE et al., 1999).

A associação simbionte entre formigas e fungo data de aproximadamente 50 milhões de anos (SCHULTZ, 1999; MUELLER et al., 2001). Esse mutualismo teria origem com uma espécie ancestral Attini, que era forrageadora generalista e cultivava o fungo facultativamente. Com o passar do tempo, esta relação passou a ser obrigatória (MUELLER, 2002). Considerando este fato, surgiram diversas hipóteses para explicar a simbiose entre os dois organismos: (1) fornecimento de sementes; (2) micorrizas; (3) madeira podre; (4) cadáveres

de artrópodes; (5) paredes dos ninhos; (6) fezes de formigas e (7) pellets infrabucal (MUELLER et al., 2001).

As formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* apresentam distribuição geográfica desde os Estados Unidos até a Argentina (WEBER, 1970; FARJI-BRENER e RUGGIERO, 1994), sendo inexistentes nas regiões transandinas da América do Sul (WEBER, 1970; FOWLER, 1983; FARJI-BRENER e RUGGIERO, 1994), em algumas ilhas das Antilhas na América Central (MARICONI, 1970; DELLA LUCIA, 1993) e em altitudes acima de 2500 metros (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

No Brasil, ocorrem 21 espécies do gênero *Acromyrmex* (GONÇALVES, 1961; FOWLER et al., 1986; FOWLER, 1988) e 9 espécies do gênero *Atta* (DELABIE, 1998), inclusive a subespécie *Atta sexdens rubropilosa*, conhecida como "saúva limão" e considerada a mais amplamente distribuída e que causa maiores danos às lavouras (GONÇALVES, 1963).

As formigas do gênero *Atta* são insetos sociais que habitam ninhos subterrâneos, caracterizados por numerosas câmaras e galerias (MARICONI, 1970). A organização social é caracterizada pelo acentuado polimorfismo e pela divisão nas tarefas entre os indivíduos da colônia. A casta das jardineiras, operárias com cápsula cefálica entre 0,8 e 1,0 mm, é responsável pela manutenção do jardim de fungo e pelo cuidado com as crias; a casta das operárias generalistas, que possuem cápsula cefálica aproximada de 1,4 mm de largura, tem a tarefa de explorar novos recursos alimentares, escavar ninhos e realizar o corte e o transporte do material vegetal; a casta dos soldados, operárias que possuem largura da cápsula cefálica de aproximadamente 3,0 mm, desempenha a função de defender a colônia, podendo, ocasionalmente, cortar e transportar material vegetal. Além de todas as castas citadas, existe a rainha, responsável por promover o aumento da colônia. As formas aladas içás (fêmeas) e bitus (machos) aparecem apenas em época reprodutiva (WILSON, 1980; FORTI e BOARETTO, 1997).

2.2 Seletividade de plantas pelas formigas cortadeiras

Apesar de as saúvas cortarem folhas e flores de várias espécies vegetais, elas apresentam certas preferências (BLANTON e EWEL, 1985).

Frequentemente, as espécies de plantas introduzidas são mais suscetíveis ao ataque das formigas cortadeiras (CHERRETT, 1972), enquanto algumas espécies nativas são imunes a este ataque (LITTLEDYKE e CHERRETT, 1975, 1978).

Num estudo de Cherrett e Seaforth (1970), houve uma análise sobre as preferências das saúvas, com o objetivo de identificar as substâncias quimio-estimulantes que tornavam *Citrus paradisi* (toranja) e *Hibiscus rosa-sinensis* atraentes para as formigas. Das frações que foram purificadas, a mais ativa consistiu principalmente de carboidratos, aminoácidos, ácido fenólico e outros glicosídeos, com resultados similares para ambas as plantas.

As formigas são consideradas insetos altamente organizados e engenhosos, que podem identificar quase que imediatamente qualquer substância que interfira na vida normal da colônia (FONTES e PETENUCCI, 1972). Segundo Barrer e Cherrett (1972), a seiva liberada pelas folhas a partir do corte, já seria o suficiente para levar informações químicas do vegetal às formigas.

Rockwood (1976) relatou que a seleção de plantas cortadas pelas formigas do gênero *Atta* está relacionada com as diferenças no valor nutritivo, teor de umidade e compostos secundários.

2.3 Biologia das Saúvas

Uma vez por ano, as colônias de *Atta* produzem machos e fêmeas alados para que haja a reprodução. Na região sudeste, este fenômeno ocorre nas primeiras chuvas da primavera.

O acasalamento é realizado a partir da revoada (também chamada de vôo nupcial), que geralmente acontece em dias claros, quentes e úmidos. Após algum tempo sobre o formigueiro, as içás (fêmeas) levantam vôo, sendo seguidas pelos bitus (machos). Quando a revoada se torna geral, o acasalamento acontece no ar (MARICONI, 1970).

As fêmeas de *Atta sexdens rubropilosa* são capazes de acumular de 200 a 320 milhões de espermatozóides em sua espermateca e podem copular com 5 a 8 machos, pois cada um deles possui de 40 a 80 milhões de espermatozóides (DELLA LUCIA e BENTO, 1993).

Imediatamente após a fecundação, as içás retornam ao solo, livram-se das asas e procuram locais de vegetação menos densa para iniciar a escavação de seu ninho (DELLA LUCIA, 1993). Elas escavam um canal de aproximadamente 8,5 a 18 cm de profundidade, construindo a primeira câmara onde o fungo simbionte trazido por ela em sua cavidade infrabucal da colônia de origem, é regurgitado (WILSON, 1980).

2.4 Formigas cortadeiras como pragas

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são consideradas pragas importantes nas regiões tropicais americanas. Isso porque a densidade populacional aumenta muito, através da proliferação de colônias, que possuem grande capacidade de colonização e forrageamento. Essa característica, quando aliada a ambientes em desequilíbrio ecológico por ação antrópica, propicia condições ideais para o desenvolvimento destas formigas. (CHERRETT, 1986; DELLA LUCIA e FOWLER, 1993).

As cortadeiras são responsáveis por danos econômicos em reflorestamentos (VILELA, 1986; ANJOS et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1998; PERREIRA et al., 1999), na agricultura (MARICONI, 1970; CHERRETT, 1986) e em pastagens (AMANTE, 1967; FOWLER et al., 1986). Além destes prejuízos, existem outros problemas de forma indireta, como a grande quantidade de agrotóxicos que são aplicadas na tentativa de controle destes insetos, o que afeta a saúde humana e de outros animais (DELLA LUCIA e FOWLER, 1993), além de trazer prejuízos ao meio ambiente.

2.5 Controle das formigas cortadeiras

Em razão dos danos econômicos que causam, principalmente nas áreas de culturas agrícolas, as saúvas têm sido alvo de várias tentativas de controle, que incluem desde receitas caseiras, que passam de geração para geração, até recursos de alta tecnologia, que não apresentaram resultados muito significativos (DELLA LUCIA e VILELA, 1993). Atualmente, estas formigas podem ser controladas com barreiras mecânicas e métodos culturais, biológicos e químicos.

2.5.1 Controle mecânico

O controle mecânico de formigas cortadeiras se dá pela destruição dos ninhos da área, através da escavação do formigueiro, que é efetuada até que a rainha seja localizada e morta. É uma alternativa razoável de controle quando realizado em pequenas áreas e onde os ninhos estejam superficiais, porém o esforço demandado é grande (DELLA LUCIA et al., 1993). Na

prática, torna-se inviável em áreas de plantios comerciais, em reflorestamentos e sistemas de pastagens (FORTI e BOARETTO, 1997).

2.5.2 Controle cultural

O controle cultural consiste em arar determinada área, dentro do prazo de 4 meses do início do formigueiro. É um método importante para formigueiros pequenos, que serão eliminados se a lâmina do arado matar a rainha (DELLA LUCIA et al., 1993). Esse controle basicamente deixou de existir para formigueiros adultos, pois em *Atta*, o efeito pode ser até prejudicial, já que mexer no solo pode descaracterizar parcialmente o formigueiro, cessando a sua atividade por certo período de tempo e dando a falsa impressão de que foi controlado. Além disso, acaba dificultando a sua posterior localização (FORTI e BOARETTO, 1997).

2.5.3 Controle biológico

O controle biológico consiste no emprego de predadores, parasitas e micro-organismos (fungos, bactérias e vírus) que utilizam a formiga cortadeira como hospedeiro (FORTI e BOARETTO, 1997). Existem algumas dificuldades neste tipo de controle, dentre as quais está a detecção de micro-organismos através das antenas destas formigas (KERMARRECA et al., 1993). Assim, a introdução de inimigos naturais ainda não pode ser considerada uma estratégia de controle para as formigas cortadeiras. Deve, contudo, ser sempre lembrado como técnica de manejo integrado de pragas (DELLA LUCIA e VILELA, 1993).

2.5.4 Controle químico

Existem várias estratégias de controle químico, que são diferenciadas essencialmente pela formulação e pelo tipo de aplicação dos inseticidas. São elas:

Fumigantes: o método consiste na utilização de gases tóxicos, como o brometo de metila. Apesar de ser altamente eficaz, exige mão de obra especializada para a aplicação, além de ser uma alternativa de alto custo e alta periculosidade ao aplicador (DELLA LUCIA e VILELA,

1993; FORTI e BOARETTO, 1997). Além disso, o brometo de metila está incluído na lista de substâncias que destroem a camada de ozônio. Sendo assim, segundo o informativo do Programa Nacional de Eliminação do Brometo de Metila, os países que assinaram o Protocolo de Montreal em 1987, devem eliminar completamente seu uso até 2015.

Pós-químicos: formicidas que possuem ação de contato. A aplicação consiste em polvilhar estes produtos com o uso de equipamentos manuais. A ação é limitada, já que o produto não atinge todas as câmaras de ninhos adultos, além de grande parte ficar aderida ao solo, por causa da umidade. Entre 24 e 48 horas antes da aplicação, deve-se remover a terra solta dos formigueiros (BOARETTO e FORTI, 1997).

Iscas granuladas: são formuladas em pellets e constituídas de princípio ativo tóxico aliado a um substrato atrativo (FORTI e BOARETTO, 1997). Os pellets são colocados próximos ao formigueiro e transportados pelas formigas para dentro da colônia. A aplicação é fácil, por não necessitar de ferramentas específicas, além de ser um método econômico e eficiente. Porém, não pode ser utilizado em períodos chuvosos (ANJOS et al., 1993; DELLA LUCIA e VILELA, 1993), além de intoxicar, também, as espécies que não são alvo (RAMOS et al., 2003).

Termonebulização: consiste na introdução, através dos olheiros, de um inseticida veiculado em óleo mineral ou diesel sob a ação de calor, o que produz pequenas partículas semelhantes a "fumaça" tóxica dentro do formigueiro. Para isso é utilizado um aparelho chamado de termonebulizador (DELLA LUCA e VILELA, 1993; FORTI e BOARETTO, 1997). É um método eficiente que permite a rápida paralisação das atividades do formigueiro (DELLA LUCIA e VILELA, 1993). Pode ser aplicado em qualquer tipo de solo e é eficiente até nos grandes ninhos (FORTI e BOARETTO, 1997). Por outro lado, a manutenção do equipamento possui custo elevado e há necessidade de formulação especial do formicida (DELLA LUCIA e VILELA, 1993).

Nebulização: para este método deve ser utilizado um aparelho chamado de Aero-system, que permite criar partículas a frio. Alguns estudos indicam que esta técnica só é eficiente em formigueiros novos (FORTI e BOARETTO, 1997; BOARETTO e FORTI, 1997).

Mesmo com suas várias restrições, o controle químico é o único que apresenta tecnologia disponível para utilização prática no controle de formigas cortadeiras (JUSTI Jr. et al., 1996). Apesar de ser o tipo de controle que mais apresenta resultados, ele é prejudicial ao meio ambiente, por contaminar o solo e pela possibilidade de causar problemas à fauna local.

2.6 Plantas tóxicas às formigas cortadeiras ou ao fungo simbionte

Inicialmente, os produtos utilizados para controle de pragas eram naturais, obtidos a partir de partes das plantas ou de minerais extraídos da terra (JACOBSON, 1989). Porém, com o tempo, estes foram sendo substituídos por produtos sintéticos, que apresentavam efeito mais rápido (VIEGAS Jr., 2003). No entanto, o uso em larga escala destes inseticidas causou a contaminação do ambiente e prejudicou organismos não alvo (BERENBAUM, 1989).

Por esses motivos, muitos pesquisadores voltaram a se interessar pelo controle de pragas através de produtos naturais. A vantagem destes produtos é que não são persistentes no ambiente, além de não deixarem resíduos nos alimentos e possuírem baixo custo (ROEL, 2001). Segundo Jacobson (1989), os derivados botânicos mais promissores são aqueles pertencentes às famílias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae e Canellaceae. Isman (2000) afirma que os óleos essenciais, principalmente das espécies pertencentes às famílias Lamiaceae e Myrtaceae estão entre os inseticidas naturais que apresentam resultados notáveis.

Reunindo alguns estudos, algumas substâncias que se destacaram foram a piretrina, extraída de *Chrysanthemum* (família Compositae), a nicotina extraída de *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) e a rotenona, encontrada em algumas leguminosas (ADDOR, 1994; GODFREY, 1994).

As pesquisas priorizam as plantas que não são cortadas pelas formigas, o que pode representar uma indicação de que elas possuem alguns compostos químicos, como metabólitos secundários, que funcionam como repelentes. Como exemplo disso, pode-se citar um estudo de 1983, de Hubbell & Wiemer. Eles isolaram o terpenoide epóxido cariofileno da árvore tropical *Hymenaea courbaril*, da família Caesalpiniaceae, que era repelente para as formigas. Em seguida, Howard et al. (1988) descobriram que este composto era letal para o fungo simbionte de *Atta cephalotes*.

Em 1979, Mullenax descobriu que, tratando colônias de *Atta* sp. com as folhas de *Canavalia ensiformis* (fava-branca), família Fabaceae, ocorria diminuição da atividade da colônia. Ele sugeriu que isso acontecia por causa da desmetilomopterocarpina, que possui

ação fungicida. Porém, Stradling & Powell (1992), acreditavam que os efeitos tóxicos eram causados pelo aminoácido canavanina. Monteiro et al. (1998) indicaram que os efeitos inibitórios sobre o fungo eram decorrentes de uma mistura de ácidos graxos, que foi isolada dos extratos foliares da planta.

Mais tarde, Hebling et al. (2000) estudaram os efeitos tóxicos das folhas frescas de *Canavalia ensiformis* em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório, observando alta taxa de mortalidade das formigas, bem como a redução da esponja fúngica. Após 11 semanas de tratamento, o formigueiro estava extinto. Takahashi-del-Bianco (2002) realizou bioensaios com operárias médias de *Atta sexdens rubrobilosa* e sugeriu que a atividade tóxica da planta estaria relacionada à mistura de açúcares e a misturas complexas de ácidos graxos.

O gergelim (*Sesamum indicum*), família Pedaliaceae, é outra planta bem estudada. Colônias de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas exclusivamente com as folhas de gergelim apresentaram redução do jardim de fungo e alterações no comportamento das operárias. O resultado foi a extinção dos formigueiros (BUENO et al., 1995). Análises das plantas revelaram a presença de compostos com efeitos inibitórios ao fungo e tóxicos às formigas (PAGNOCCA et al., 1990). Hebling-Beraldo (1991) verificou que as colônias tratadas com folhas de gergelim apresentavam alterações no metabolismo respiratório.

A presença de lignanas nas sementes é fundamental para inibir o fungo. Entre estes compostos estão a sesamina e a sesamolina, que são sinergistas de vários inseticidas (PAGNOCCA et al., 1996). Morini et al. (2005), descobriu que a toxicidade para as formigas está relacionada à grande quantidade de lipídios da semente. Nas folhas, a toxicidade é proveniente de uma mistura complexa de açúcares (BUENO et al., 2004b).

Uma linha de pesquisa relacionada ao estudo de plantas tóxicas às formigas cortadeiras é desenvolvida há quase 30 anos por pesquisadores do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro em parceria com pesquisadores do Labortório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos. Assim, as plantas são testadas em bioensaios com as formigas. Em seguida, as que apresentarem atividade, serão fracionadas e testadas novamente. O processo é repetido até que os compostos tóxicos sejam identificados e possam ser aplicados em colônias incipientes de laboratório através de nebulização ou iscas granuladas. Se os compostos forem considerados tóxicos nos testes de laboratório, passam a ser testados em colônias de campo (BUENO F.C., 2005).

2.7 Plantas utilizadas

As plantas escolhidas para serem testadas foram *Magonia pubescens* e *Duguetia lanceolata*.

M. pubescens vem sendo estudada como alternativa de controle para larvas de *Aedes aegypti*. Num trabalho de Arruda et al. (2003), larvas de *A. aegypti* no terceiro estádio de desenvolvimento foram colocadas em frascos que continham solução do extrato desta planta, o que resultou em ações deletérias, principalmente nas células mesentéricas das larvas.

Outra potencial aplicação tóxica desta planta foi descoberta mais recentemente, por Fernandes et al. (2008), contra as larvas do carrapato vermelho do cão *Rhipicephalus sanguineus*. As larvas foram colocadas em papel filtro impregnado com diferentes concentrações do extrato. A mortalidade ou falta de motilidade das larvas foi observada até mesmo nas menores concentrações, ainda que de forma branda em relação às concentrações mais elevadas.

Em relação à *D. lanceolata* não existem, até o momento, trabalhos que tenham testado seu potencial tóxico. No entanto, ela pertence à família Annonaceae, a qual apresenta como um dos principais constituintes as acetogeninas. Estas acetogeninas são uma classe de substâncias que apresentam grande potencial citotóxico e genotóxico (NASCIMENTO, 2008).

2.7.1 *Magonia pubescens* (Tingui)

A planta pertence à família Sapindaceae. Possui 5 a 9 metros de altura, com tronco de 20 a 30 cm de diâmetro. As folhas são compostas paripenadas, possuindo de 3 a 6 pares de folíolos glabros (LORENZI, 2000).

M. pubescens (Figura 01) se distribui do Ceará até Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, no Cerrado (LORENZI, 2000). A madeira é resistente ao ataque de organismos xilófagos. Os fungos xilófagos são os causadores das podridões branca ou parda. Eles são os responsáveis pelas maiores perdas causadas a estruturas de madeira, como postes, dormentes e outras (PAES et al., 2005).

Segundo Lorenzi (2000), a madeira de *M. pubescens* é empregada na construção civil, além de ser utilizada também para lenha e carvão. A infusão da casca da raiz é utilizada para intoxicar peixes das lagoas, um método que torna mais fácil sua captura. A árvore é bastante ornamental, principalmente por ter a folhagem com aspecto de renda, podendo ser empregada

na composição de jardins, praças e arborização de ruas estreitas. É uma planta pioneira adaptada a terrenos fracos, indicada para plantios de áreas degradadas de preservação permanente.

Magonia pubescens é uma planta decídua, heliófita, seletiva xerófita. Ocorre em frequência moderada, tanto em formações primárias como em secundárias, porém em terrenos altos e bem drenados. Produz anualmente uma quantidade moderada de sementes viáveis. Floresce durante os meses de agosto e setembro (LORENZI, 2000).

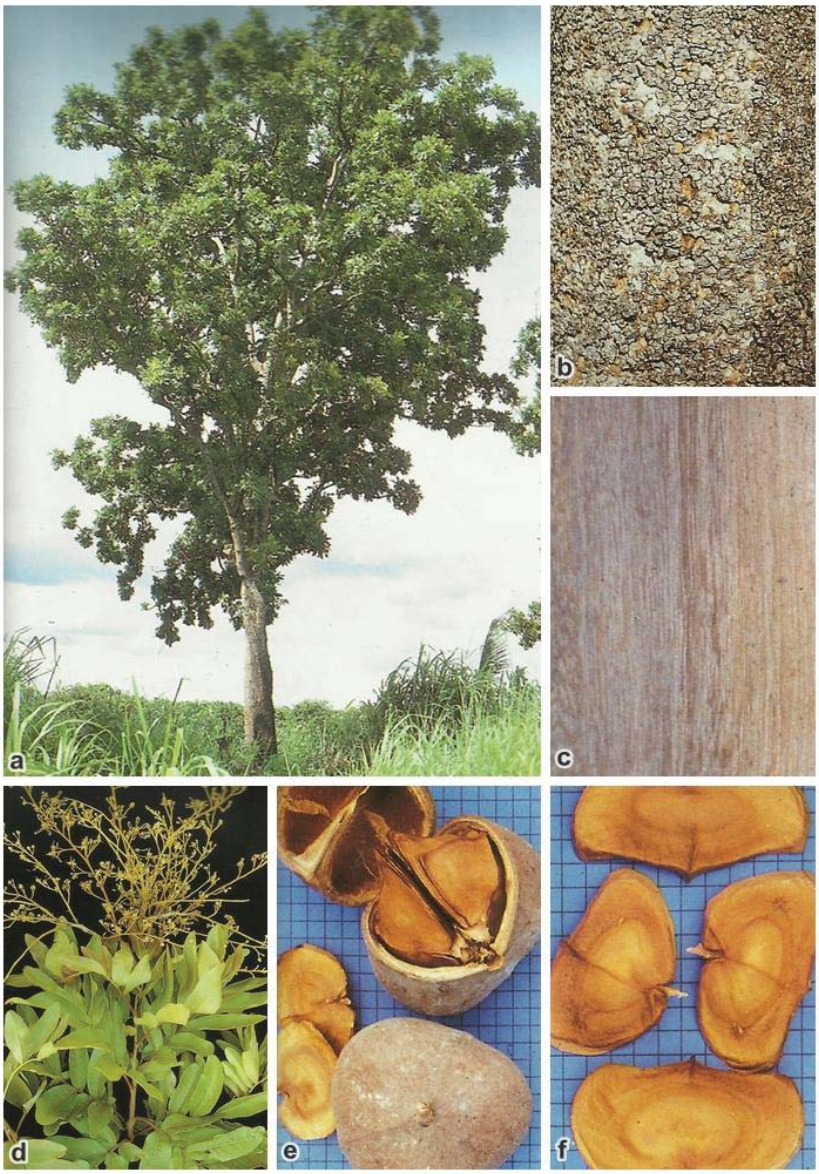


Figura 01: *Magonia pubescens*: a. Árvore; b. Tronco; c. Madeira; d. Folhas; e. Frutos; f. Sementes. Escala: quadrado = 1 X 1 cm. (Figuras retiradas de LORENZI, 2000).

2.7.2 *Duguetia lanceolata* (Pindaíva)

A planta *Duguetia lanceolata* (Figura 02) pertence à família Annonaceae. Tem entre 15 e 20 metros de altura. Seu tronco tem 40 a 60 cm de diâmetro. As folhas são simples e glabras. Ela ocorre em Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul, em especial na floresta semidecídua de altitude e na mata pluvial atlântica. A madeira é pesada e de baixa resistência ao apodrecimento. Porém, tem resistência ao ataque de cupins. É utilizada na construção civil e na confecção de móveis (LORENZI, 2000).

A árvore é esbelta e elegante, servindo para o paisagismo. Os frutos são comestíveis e são muito procurados pela fauna em geral. Apesar de apresentar crescimento lento, ela é indicada para plantio em áreas degradadas de preservação permanente.

D. lanceolata é perenifólia e heliófita. Ocorre geralmente em agrupamentos populacionais muito homogêneos em topos de morro onde o solo é bem drenado. É comum, também, em várzeas e beira de rios, porém sempre em barrancos bem drenados. Ela ocorre tanto no interior da mata primária como em formações abertas e secundárias. Produz anualmente uma pequena quantidade de sementes viáveis. Floresce durante os meses de outubro e novembro (LORENZI, 2000).

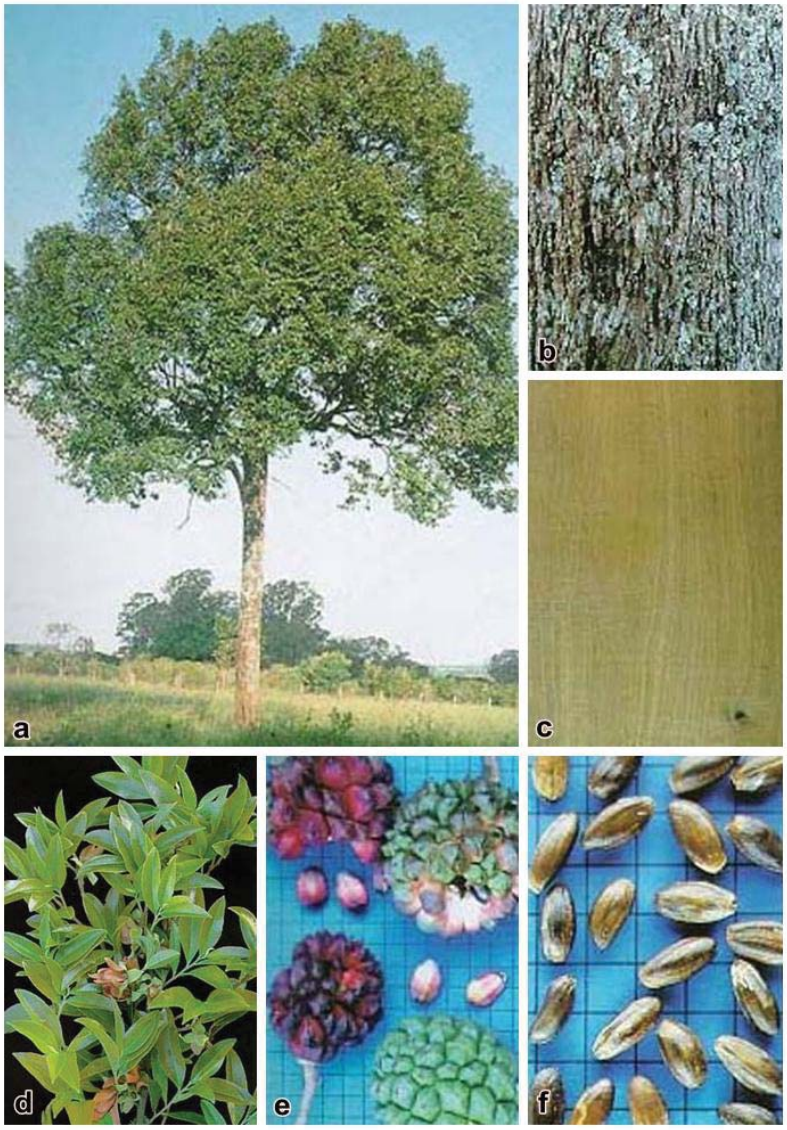


Figura 02: *Duguetia lanceolata*: a. Árvore; b. Tronco; c. Madeira; d. Folhas; e. Frutos; f. Sementes. Escala: quadrado = 1 X 1 cm. (Figuras retiradas de LORENZI, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem das formigas

As operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram coletadas de formigueiros (Figura 03) mantidos em laboratório no Centro de Estudos de Insetos Sociais, localizado no Instituto de Biociências de Rio Claro.

Para a manutenção destes formigueiros, são oferecidas, diariamente, folhas de eucalipto, flocos de aveia e farinha de milho. Ocasionalmente, são oferecidas outras plantas palatáveis como *Hibiscus*, *Ligustrum* ou folhas e pétalas de roseiras.



Figura 03: Formigueiro mantido no laboratório de formigas cortadeiras do Centro de Estudos de Insetos Sociais. A estrutura tem 1 metro de largura por 2 m de comprimento.

3.2 Extração das substâncias

A extração das substâncias foi realizada pela aluna Vanessa de Cássia Domingues, vinculada ao Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, sob a coordenação do Prof. Dr. João Batista Fernandes.

Após a coleta das folhas, ramos, sementes e cascas dos frutos de *Duguetia lanceolata*, o material foi seco em estufa de circulação de ar a 40°C, por aproximadamente 72 horas. Posteriormente, foi pulverizado em um moinho tipo Willey. Em seguida os pulverizados foram submetidos a três extrações consecutivas com etanol, à temperatura ambiente, na proporção 5:1 (em que 5 é o volume de solvente e 1 é o peso do material vegetal), com intervalo de três dias entre cada extração, em repouso com etanol. Os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo. Foram obtidos os extratos DLER (ramos), DLEF (folhas), DLECaf (casca dos frutos) e DLES (sementes). Estes, por sua vez, foram submetidos a uma partição líquido-líquido utilizando uma fase hidroalcoólica MeOH:H2O (1:3). Em um funil de separação adicionou-se o extrato solubilizado em 100 mL de metanol e 300 mL de água. Em seguida as extrações foram feitas com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e acetato de etila) conforme mostra o Fluxograma (Figura 04).

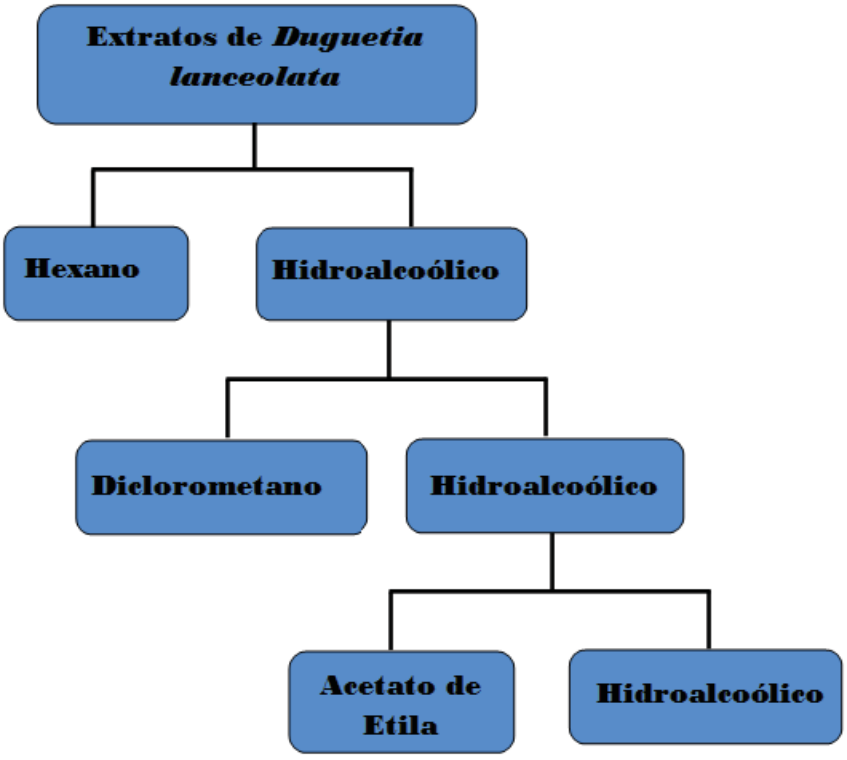


Figura 04: Fluxograma para ilustrar como são feitas as partições dos extratos.

Para obter as partições líquido-líquido (Tabela 01) do extrato etanólico dos ramos de *D. lanceolata*, foram seguidos os seguintes procedimentos:

(1) Extração com hexano por três vezes com 200 mL por vez,

(2) Extração com diclorometano por três vezes com 200 mL por vez,

(3) Extração com acetato de etila por três vezes, com 200 mL por vez,

(4) Fração hidroalcoólica (metanol/água).

Tabela 01: Tabela que mostra as partições líquido-líquido de *Duguetia lanceolata*.

EXTRATO	PARTIÇÕES
RAMOS	DLER – Hexano
	DLER – Diclorometano
	DLER - Acetato de Etila
	DLER – Hidroalcoólica
FOLHAS	DLEF – Hexano
	DLEF – Diclorometano
	DLEF - Acetato de Etila
	DLEF – Hidroalcoólica
SEMENTES	DLES – Hexano
	DLES – Diclorometano
	DLES - Acetato de Etila
	DLES – Hidroalcoólica
CASCA DOS FRUTOS	DLECaf – Hexano
	DLECaf – Diclorometano
	DLECaf - Acetato de Etila
	DLECaf – Hidroalcoólica

O extrato DLEF-hex foi então submetido a uma coluna cromatográfica, sob vácuo, nas condições especificadas abaixo:

- Coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh)
- Diâmetro (ϕ) = 5,5 cm
- Altura (h) = 25cm
- Solvente: Gradiente hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e metanol:água (3:1 v/V)

Para o material vegetal de *M. pubescens*, o procedimento seguido foi o mesmo. Porém, como os extratos são muito polares, não foi possível fazer a coluna a vácuo, pois a separação não foi eficaz.

3.3 Bioensaios de toxicidade de extratos

Para a realização dos experimentos, as formigas foram coletadas e colocadas em uma bandeja plástica, com as paredes laterais revestidas com Teflon-30. No interior da bandeja foi mantido algodão embebido em água.

As formigas foram agrupadas em 10 indivíduos e colocadas em placas de Petri descartáveis (Figura 05), de 10 cm de diâmetro, forradas com papel filtro. Cada placa recebeu, diariamente, uma pequena quantidade (aproximadamente 0,5 g) de dieta artificial, colocada sobre o papel alumínio. Para cada tratamento, foram utilizadas 5 placas, que equivalem a um lote de 50 formigas.

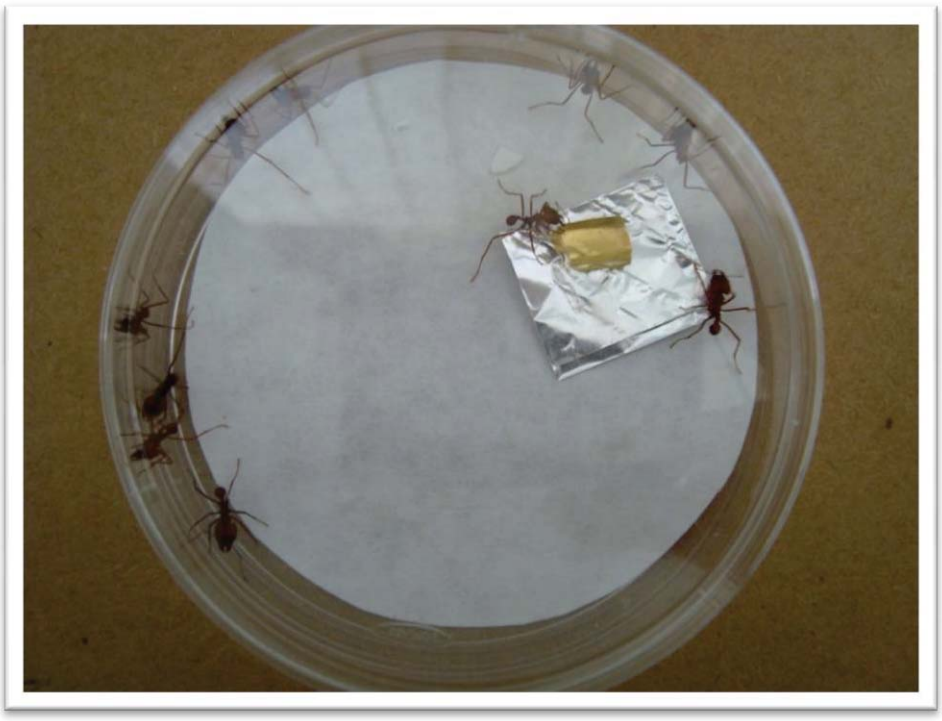


Figura 05: Imagem ilustrando uma das placas do bioensaio. Para cada tratamento são usadas cinco placas. Em cada placa, são colocadas 10 formigas, alimentadas diariamente com a dieta artificial.

Estas placas foram mantidas em estufa para B.O.D. (Figura 06) com temperatura de 24°C ± 1°C e umidade relativa acima de 70%. Diariamente, elas foram examinadas para que as formigas mortas fossem retiradas e para que ocorresse a troca da dieta artificial e do papel filtro. O número de formigas mortas foi anotado.



Figura 06: Estufa para B.O.D., onde as formigas ficam armazenadas ao longo dos 25 dias do experimento.

O período de duração dos experimentos foi de 25 dias, para que o tempo de vida de cada operária não interferisse nos resultados.

3.3.1 Dieta Artificial

Para a manutenção das formigas isoladas do formigueiro e, consequentemente, desprovidas de sua dieta natural, foi utilizada uma dieta artificial sólida (BUENO et al., 1997), preparada com 1,25 g de glicose, 0,25 g de peptona bacteriológica, 0,025 g de extrato de levedura e 0,25 g de ágar bacteriológico, dissolvidos em 25 mL de água destilada.

Juntamente com essa mistura, nas placas de tratamento por ingestão, foram utilizados os extratos que eram enviados pela pesquisadora Vanessa Domingues do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

A dieta foi aquecida em forno microondas, para melhor solubilização dos ingredientes e, posteriormente, autoclavada a 120°C e 1 atm por 20 minutos. Em seguida, foi vertida ainda quente em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, esterilizadas pelo mesmo procedimento.

Após a solidificação da dieta, as placas foram embrulhadas com filme de PVC e mantidas em geladeira para melhor conservação e para evitar a contaminação por fungos e leveduras.

3.3.2 Tratamento por ingestão

Neste tipo de tratamento, os extratos foram incorporados à dieta pelo método dry-mix, que consiste em misturar glicose ao material a ser testado e macerar a mistura antes de adicioná-la ao restante dos ingredientes. A dieta foi oferecida para as formigas durante os 25 dias do experimento.

Para o controle, utilizou-se a dieta pura, ou seja, livre dos extratos. Esse procedimento foi utilizado para avaliar a sobrevivência das formigas com referência à temperatura, à umidade e ao manuseio.

3.3.3 Tratamento tópico

Neste tratamento, as formigas coletadas foram imobilizadas, com o auxílio de uma pinça entomológica, para a aplicação das substâncias a serem testadas, que foram colocadas no pronoto de cada operária, utilizando uma pipeta de precisão.

Foram feitos dois controles: em um deles não ocorreu aplicação tópica de nenhuma substância; no outro, houve a aplicação de 1 µL de acetona, que foi o solvente utilizado. O controle acetona teve o objetivo de avaliar a sobrevivência das operárias em relação ao manuseio durante a aplicação e à toxicidade do solvente.

Foram testados dois tratamentos de óleo essencial de *D. lanceolata*, nas concentrações de 50 µg/µL e 100 µg/µL. Os ingredientes ativos foram dissolvidos em acetona, nas concentrações estipuladas.

Após a aplicação, as formigas foram depositadas em uma bandeja até se recuperarem de seu estado de torpor, provocado pelo vapor da solução. Posteriormente, foram colocadas nas placas. Durante os 25 dias de experimento, as formigas foram alimentadas com dieta pura.

3.4 Análise dos dados

Para a análise dos dados, foi utilizado o software Graph-Pad, aplicativo Prisma 3.0.

Inicialmente, foram traçadas as curvas de sobrevivência para cada tratamento, a partir das porcentagens de formigas vivas por dia, no conjunto das 5 placas.

Para a análise estatística dos resultados obtidos após o período de 25 dias, foi empregado o teste não paramétrico "log-rank". As curvas de sobrevivência de operárias tratadas com as dietas que continham extratos foram comparadas com as operárias do controle.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Toxicidade de *Magonia pubescens* para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Esta planta apresentou bons resultados em alguns dos tratamentos. A partir dos bioensaios realizados com os extratos brutos, pôde-se perceber que o caule era a parte do organismo que concentrava maior atividade. Assim, foram feitas partições líquido-líquido para dar continuidade ao trabalho.

Os experimentos seguintes indicaram que as frações hidroalcoólica e acetato de etila apresentaram resultados melhores em relação às frações hexânica e diclorometânica. As partições foram então colocadas na coluna a vácuo. No entanto, foi impossível separar as substâncias, por serem muito polares. O que aumenta a polaridade dos extratos da *M. pubescens* é a presença muito acentuada de taninos.

Os taninos são componentes polifenólicos encontrados em algumas plantas (MAKKAR e BECKER, 1998; SANTOS et al., 1997). Eles são responsáveis pelo controle de insetos, fungos e bactérias (AERTS et al., 1999).

Os resultados obtidos estão apresentados abaixo.

4.1.1 Toxicidade de extratos brutos de *Magonia pubescens*

O extrato bruto do caule (MPC) apresentou bom resultado, alcançando mortalidade de 50% das operárias no quinto dia de experimento. Os extratos dos pecíolos (MPP) e das folhas (MPF), em contrapartida, apresentaram atividade muito lenta, tendo sua mortalidade média nos dias 23 e 17, respectivamente, como pode ser visto na Figura 07 e na Tabela 02.

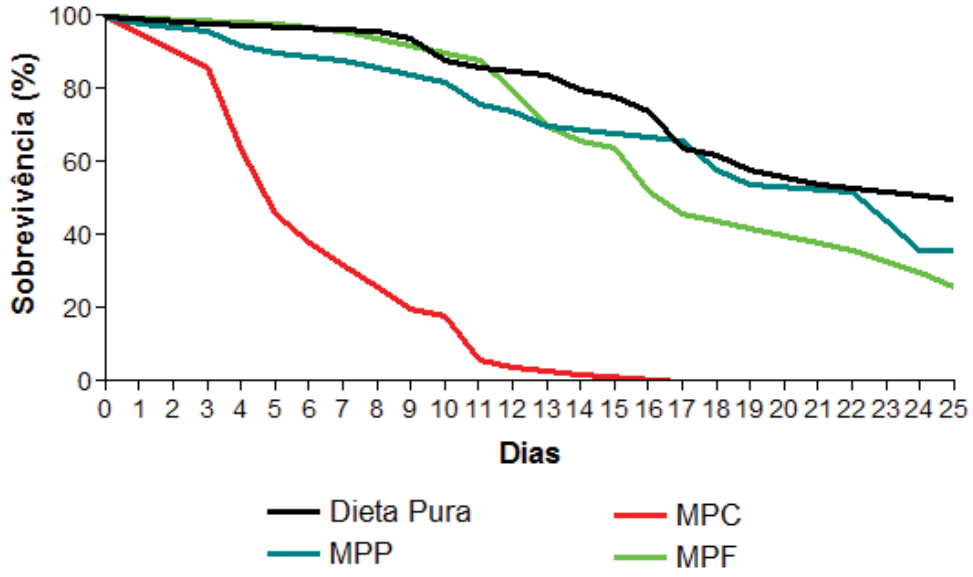


Figura 07: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos brutos de *Magonia pubescens*, na concentração de 2,0 mg/mL.

Tabela 02: Mortalidade acumulada e sobrevivência média (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Magonia pubescens*, na concentração de 2,0 mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	0	2	2	4	12	20	36	46	50	25***a***
MPP (Pecíolo)	2	2	4	10	14	18	30	34	46	64	23***a***
MPC (Caule)	0	0	14	62	74	82	98	100	100	100	5***b***
MPF (Folha)	0	0	0	2	4	10	34	54	62	74	17***b***

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($p < 0,05$).

4.1.2 Toxicidade de partições do caule de *Magonia pubescens*

No segundo teste com *M. pubescens*, o caule foi particionado e os melhores resultados foram obtidos com as partições acetato de etila e hidroalcoólica, que alcançaram mortalidade média das formigas no sexto e décimo dia, respectivamente, como pode ser visto na Figura 08

e na Tabela 03. Na partição diclorometânica, a mediana foi de 11,5; entretanto, após esse dia, houve maior estabilidade e, ao final do experimento, ainda havia 6 formigas vivas.

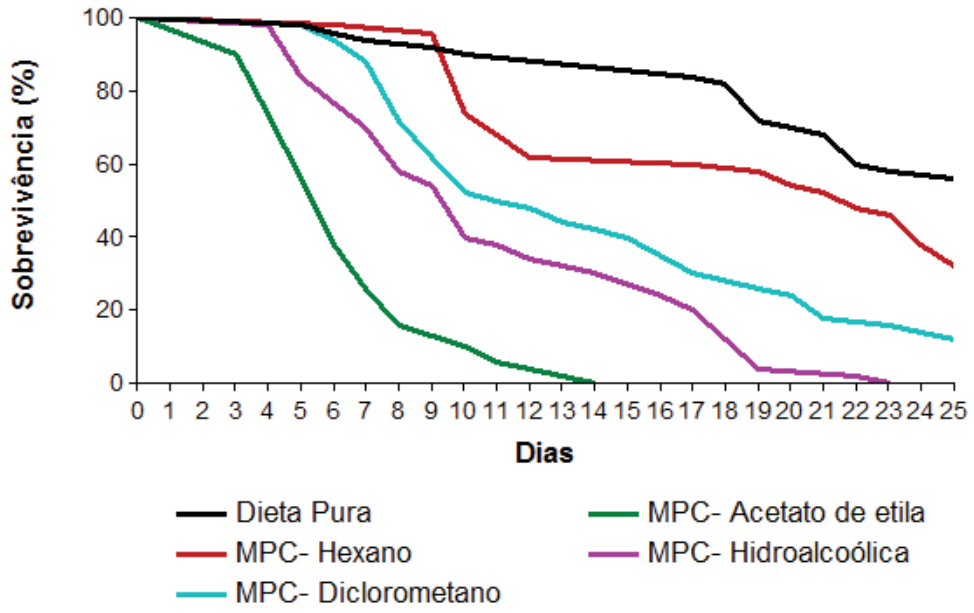


Figura 08: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Magonia pubescens*, na concentração de 2,0 mg/mL.

Tabela 03: Mortalidade acumulada e sobrevivência média (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Magonia pubescens*, na concentração de 2,0 mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	4	6	10	10	16	32	44	>25***a***
MPC - Hexano	0	0	0	2	2	26	38	40	48	68	22***b***
MPC - Diclorometano	0	0	0	6	28	48	58	70	82	88	11,5***b***
MPC – Acetato etila	0	0	10	62	84	90	100	100	100	100	6,0***b***
MPC - Hidroalcoólica	0	0	0	16	42	60	70	80	96	100	10***b***

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” ($p < 0,05$).

4.2 Toxicidade de *Duguetia lanceolata* para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

A planta apresentou bons resultados, especialmente nos extratos dos ramos, folhas e sementes. Sendo assim, todos os extratos foram fracionados, dando continuidade à metodologia. Em todos os testes das partições líquido-líquido, os melhores resultados foram obtidos nas frações hexânicas e diclorometânicas. Por este motivo, ambas foram submetidas à coluna à vácuo, para separação de substâncias. No entanto, a massa das frações diclorometânicas disponível era muito pequena, impossibilitando a separação. Já a fração hexânica foi separada e foram feitos testes com o que foi isolado.

Os resultados são apresentados abaixo.

4.2.1 Toxicidade do extrato bruto de *Duguetia lanceolata*

Neste teste, pode-se observar que houve bons resultados em todos os casos (Figura 09/Tabela 04). No extrato das folhas (DLEF) e das sementes (DLES), as medianas foram, respectivamente, 9 e 8,5. O extrato da casca do fruto (DLEcaf) apresentou 50% de mortalidade no décimo segundo dia. Já o extrato dos ramos (DLER) teve mortalidade média igual a 10,5.

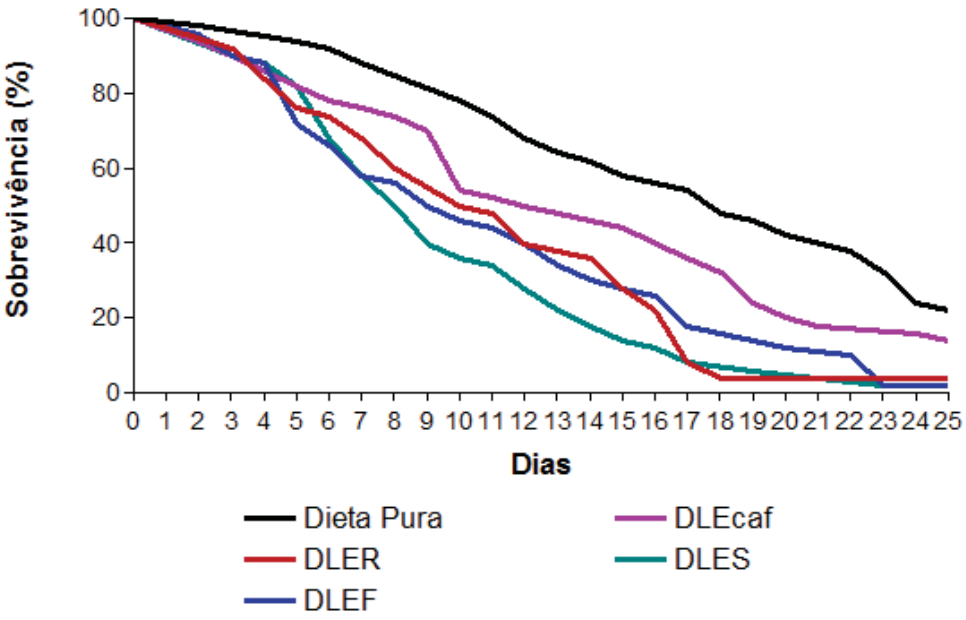


Figura 09: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Duguetia lanceolata* na concentração de 2,0 mg/mL.

Tabela 04: Mortalidade acumulada e sobrevivência média (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Duguetia lanceolata* na concentração de 2,0 mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	2	2	8	12	22	38	46	58	78	18***a***
DLER (Ramos)	0	0	8	26	40	50	64	92	96	96	10,5***b***
DLEF (Folhas)	0	4	10	34	44	54	70	82	88	98	9,0***b***
DLEcaf (Casca do fruto)	0	6	10	22	26	46	54	64	82	86	12***b***
DLES (Sementes)	0	0	10	32	50	64	82	92	96	98	8,5***b***

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($p < 0,05$).

4.2.2 Toxicidade de partições das folhas de *Duguetia lanceolata*

Os testes indicaram que as partições diclorometano (DLEF 2) e hexano (DLEF 1) apresentam maior atividade, tendo mortalidade de 50% de formigas nos dias 7 e 15, respectivamente. Em contrapartida, as partições acetato de etila (DLEF 3) e hidroalcoólica (DLEF 4) apresentaram medianas iguais a 22 e a 24, resultados não significativos.

Além disso, DLEF 2 foi a única partição na qual ocorreu mortalidade total das formigas, o que ocorreu no dia 19 do experimento. Estes resultados podem ser observados na Figura 10 e na Tabela 05.

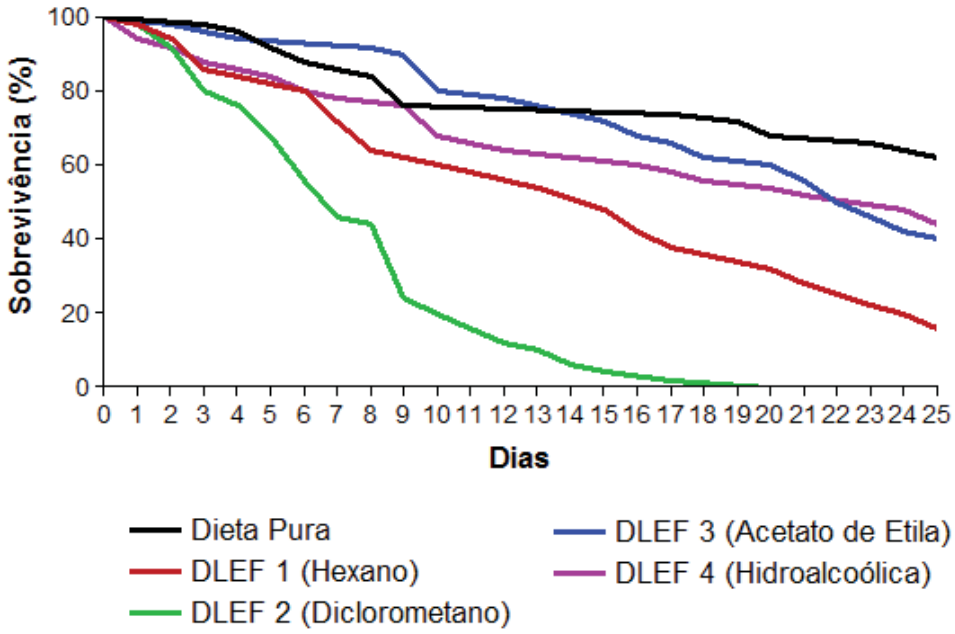


Figura 10: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos foliares de *Duguetia lanceolata*, na concentração de 1,0 mg/mL.

Tabela 05: Mortalidade acumulada e sobrevivência média (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos foliares de *Duguetia lanceolata*, na concentração de 1,0 mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	2	4	16	24	24	26	32	38	> 25 ***a***
DLEF 1 (Hex)	2	6	14	20	36	40	56	62	72	84	15 ***b***
DLEF 2 (Dicloro)	2	8	20	44	56	80	94	98	100	100	7 ***b***
DLEF 3 (AcoEt)	0	2	4	6	8	20	22	34	44	60	22 ***a***
DLEF 4 (Hidro)	6	8	12	20	22	32	36	42	48	56	24 ***a***

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($p < 0,05$).

4.2.3 Toxicidade de partições dos ramos de *Duguetia lanceolata*

Neste bioensaio, os resultados mais representativos foram, novamente, das partições hexânica (DLER 1) e diclorometânica (DLER 2), que apresentaram mortalidade de 50% das

operárias nos dias 20 e 12,5, respectivamente. As partições acetato de etila (DLER 3) e hidroalcoólica (DLER 4) não atingiram a mediana, terminando o experimento com apenas 38% das formigas mortas, em ambos os casos (Figura 11/Tabela 06).

Apesar de DLER 1 e DLER 2 terem apresentado resultado significativo pelo teste de "log rank", considera-se apenas DLER 2 com certo potencial de toxicidade.

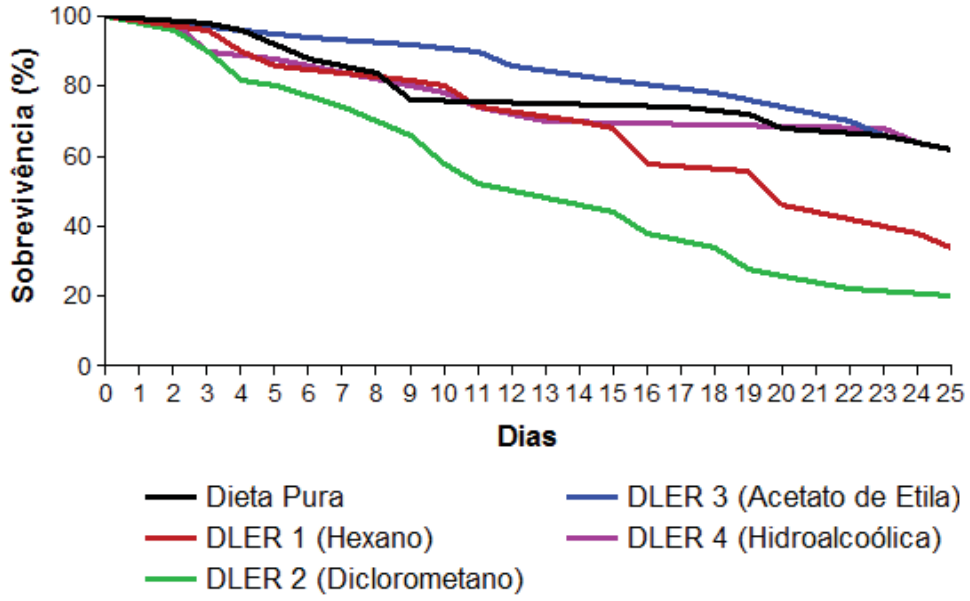


Figura 11: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos dos ramos de *Duguetia lanceolata*, na concentração de 1,0 mg/mL.

Tabela 06: Mortalidade acumulada e sobrevivência média (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos dos ramos de *Duguetia lanceolata*, na concentração de 1,0 mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	2	4	16	24	24	26	32	38	> 25 ***a***
DLER 1 (Hex)	0	0	4	14	16	20	30	42	56	66	20 ***b***
DLER 2 (Dicloro)	0	4	10	20	30	42	52	64	74	80	12,5 ***b***
DLER 3 (AcoEt)	0	0	0	6	6	8	14	18	28	38	> 25 ***a***
DLER 4 (Hidro)	0	2	10	14	14	22	30	30	30	38	> 25 ***a***

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($p < 0,05$).

4.2.4 Toxicidade de partições das sementes de *Duguetia lanceolata*

A partição diclorometano (DLES 2) apresentou maior atividade, com mortalidade média das formigas no décimo dia, e mortalidade total no décimo oitavo dia.

As partições hexano (DLES 1), acetato de etila (DLES 3) e hidroalcoólica (DLES 4) não forneceram bons resultados. DLES 4 não alcançou mediana. DLES 1 e DLES 3 tiveram medianas altas, sendo elas 25 e 24, respectivamente. Os resultados podem ser observados na Figura 12 e na Tabela 07.

Na conclusão do bioensaio, DLES 1 tinha mortalidade de 52% e DLES 3 apresentava mortalidade de 64%. O pior resultado foi de DLES 4, que terminou com apenas 44% das formigas mortas.

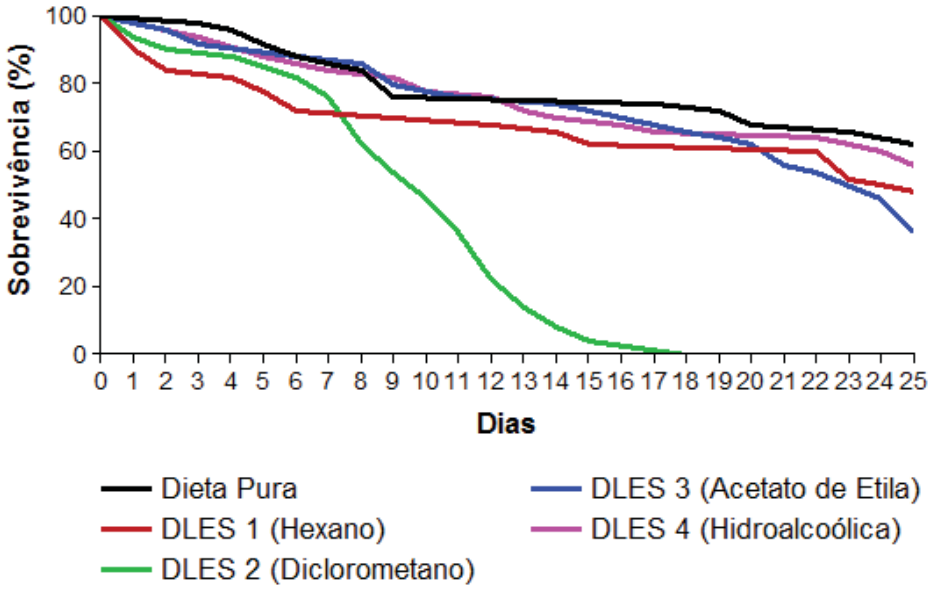


Figura 12: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos das sementes de *Duguetia lanceolata*, na concentração de 1,0 mg/mL.

Tabela 07: Mortalidade acumulada e sobrevivência média (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos das sementes de *Duguetia lanceolata*, na concentração de 1,0 mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	**2**	**3**	**6**	**8**	**10**	**14**	**17**	**21**	**25**	
Dieta Pura	0	0	2	4	16	24	24	26	32	38	> 25 ***a***
DLES 1 (Hex)	10	16	16	28	28	30	34	38	38	52	25 ***b***
DLES 2 (Dicloro)	6	10	10	18	38	54	92	96	100	100	10 ***b***
DLES 3 (AcoEt)	2	4	8	12	14	22	26	32	44	64	24 ***b***
DLES 4 (Hidro)	2	2	6	12	16	22	30	34	34	44	> 25 ***a***

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($p < 0,05$).

4.2.5 Toxicidade de partições da casca do fruto de *Duguetia lanceolata*

Nos experimentos com a casca do fruto, a atividade foi muito baixa. Na partição hexano (DLEcaf 1), a mediana foi alcançada no décimo oitavo dia. As partições diclorometano (DLEcaf 2) e acetato de etila (DLEcaf 3) tiveram mortalidade média nos dias 17 e 24. A partição hidroalcoólica (DLEcaf 4) não atingiu a mediana.

Nenhum dos materiais apresentou mortalidade total. Porém, o que se aproximou mais disso foi a partição hexânica que, ao final dos 25 dias do experimento, tinha apenas 4% de formigas vivas. Os resultados podem ser observados na Figura 13 e na Tabela 08.

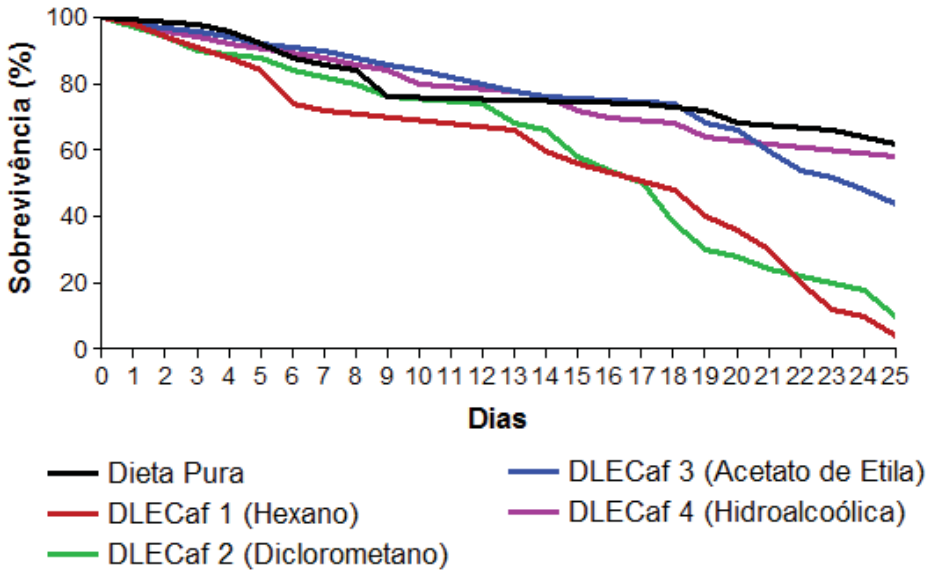


Figura 13: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos da casca do fruto de *Duguetia lanceolata*, na concentração de 1,0 mg/mL.

Tabela 08: Mortalidade acumulada e sobrevivência média (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos da casca do fruto de *Duguetia lanceolata*, na concentração de 1,0 mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	2	4	16	24	24	26	32	38	> 25 ***a***
DLECaf (Hex)	2	6	6	26	28	28	40	44	70	96	18 ***b***
DLECaf (Dicloro)	0	6	10	16	20	24	34	50	76	90	17 ***b***
DLECaf (AcoEt)	2	2	4	8	12	16	24	24	40	56	24 ***a***
DLECaf (Hidro)	2	4	6	8	14	20	24	30	38	42	> 25 ***a***

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($p < 0,05$).

4.2.6 Toxicidade de esteroides de *Duguetia lanceolata*

Os esteroides não apresentaram atividade contra as formigas. Os resultados das duas concentrações foram próximos.

Na concentração de 0,1 mg/mL, a mediana foi igual a 23. A concentração de 0,2 mg/mL não atingiu a mediana, como pode ser visto na Figura 14 e na Tabela 09.

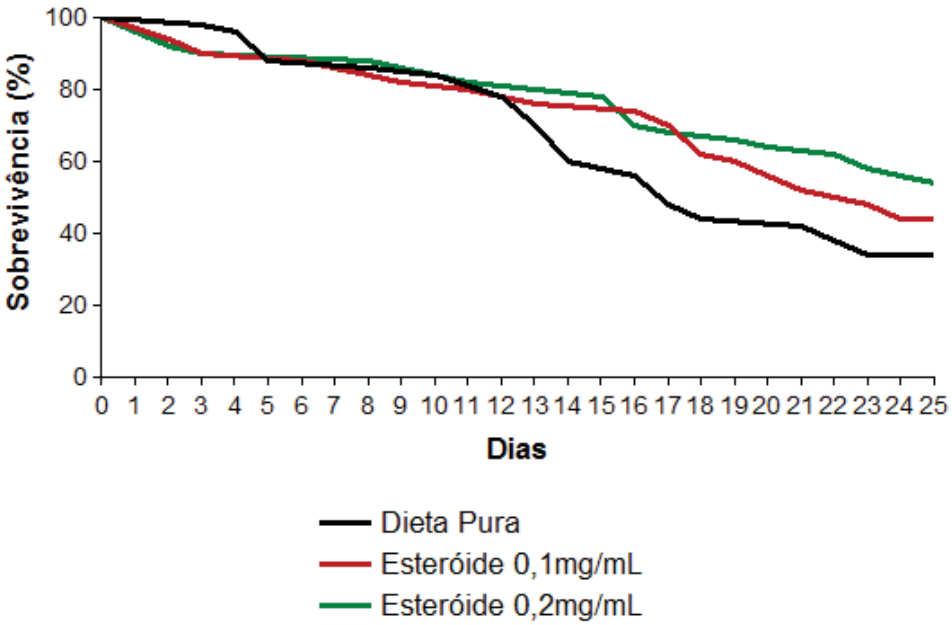


Figura 14: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os esteroides de *Duguetia lanceolata,* nas concentrações de 0,1 mg/mL e 0,2mg/mL.

Tabela 09: Mortalidade acumulada e sobrevivência média (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os esteroides de *Duguetia lanceolata,* nas concentrações de 0,1 mg/mL e 0,2mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	2	12	14	16	40	52	58	66	17***a***
Esteroide 0,1mg/mL	0	6	10	12	16	18	24	30	48	56	23***a***
Esteroide 0,2mg/mL	0	8	10	10	12	16	20	32	36	46	>25***b***

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” (p< 0,05).

4.2.7 Toxicidade de subfrações de *Duguetia lanceolata*

Estes testes também não apresentaram resultados promissores para a mortalidade das formigas cortadeiras. A única subfração que apresentou bom resultado foi a FDL 7, na qual foi utilizado metanol:água. Esta substância alcançou mediana com 9 dias e quase atingiu a mortalidade total de formigas, pois terminou o experimento com apenas 2% do número inicial de 50 operárias.

Foram extraídos três subfrações diclorometânicas (FDL 1, FDL 2 e FDL 3) porque, na coluna foram observadas três manchas diferentes. No entanto, nenhuma das três apresentou resultado significativo (Figuras 15 e 16; Tabela 10).

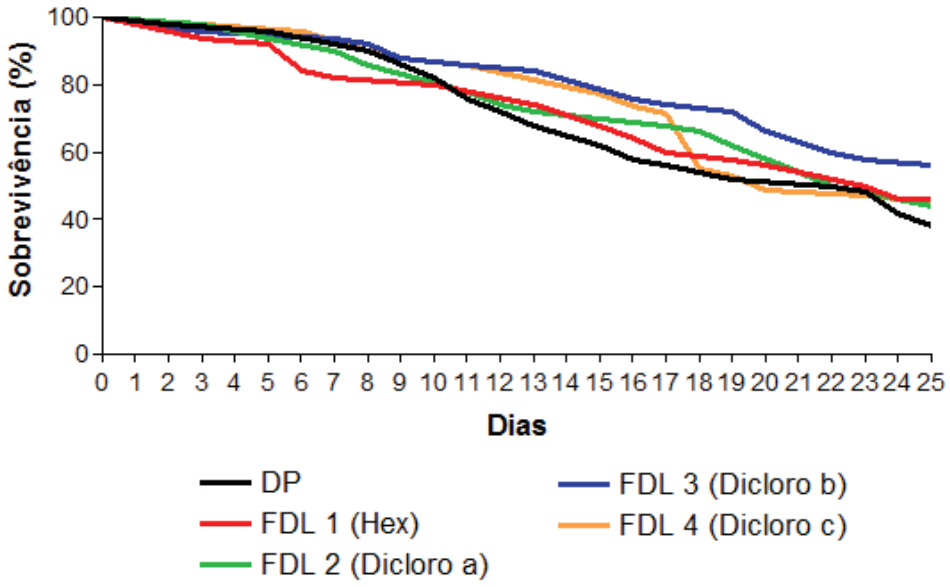


Figura 15: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as subfrações hexano e diclorometano a,b e c dos extratos hexânicos foliares de *Duguetia lanceolata*, na concentração de 1,0 mg/mL.

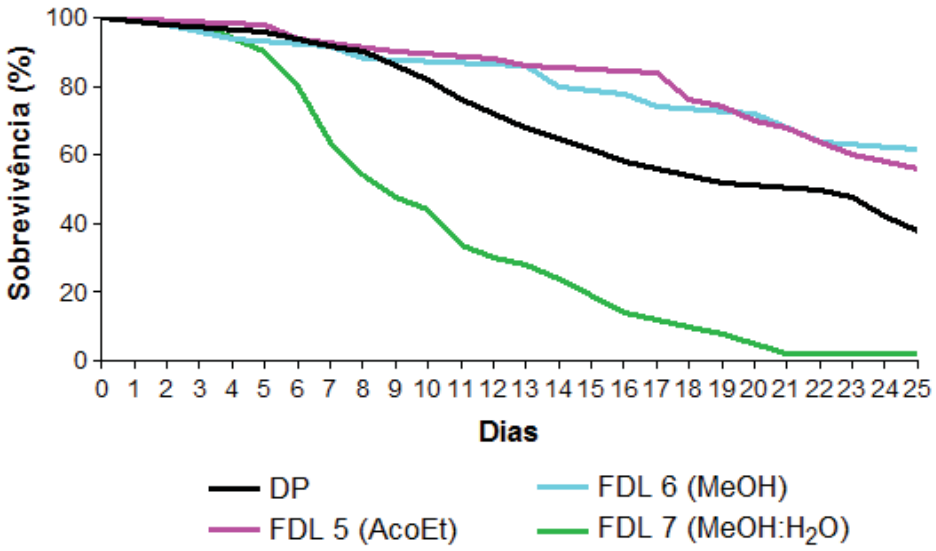


Figura 16: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com subfrações dos extratos hexânicos foliares de *Duguetia lanceolata*, na concentração de 1,0 mg/mL.

Tabela 10: Mortalidade acumulada e sobrevivência média (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com subfrações dos extratos hexânicos foliares de *Duguetia lanceolata*, na concentração de 1,0 mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	2	2	4	10	18	32	44	48	62	22,5 ***a***
FDL 1 (Hex)	0	0	6	16	18	20	26	40	46	54	23 ***a***
FDL 2 (Dicloro a)	0	0	2	6	14	14	28	32	46	52	23 ***a***
FDL 3 (Dicloro b)	0	0	4	4	8	12	16	26	34	44	> 25 ***a***
FDL 4 (Dicloro c)	0	0	0	4	10	12	20	28	50	54	20 ***a***
FDL 5 (AcoEt)	0	0	0	6	6	10	14	16	32	44	> 25 ***b***
FDL 6 (MeOH)	0	2	4	6	12	12	20	26	28	38	> 25 ***b***
FDL 7 (MeOH:H_2O)	0	0	2	20	46	52	76	86	98	98	9 ***b***

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($p < 0,05$).

4.2.8 Toxicidade de óleo essencial de *Duguetia lanceolata* (Bioensaio Tópico)

Neste experimento, o óleo essencial em concentração maior (100µg/µL) apresentou resultados razoavelmente bons. No início, a mortalidade foi muito rápida, o que pode ser notado através da mediana, que foi igual a 6. No entanto, as formigas se estabilizaram ao longo do experimento e não ocorreu mortalidade total. Ao final dos 25 dias, restavam 4% das operárias (Figura 17/Tabela 11).

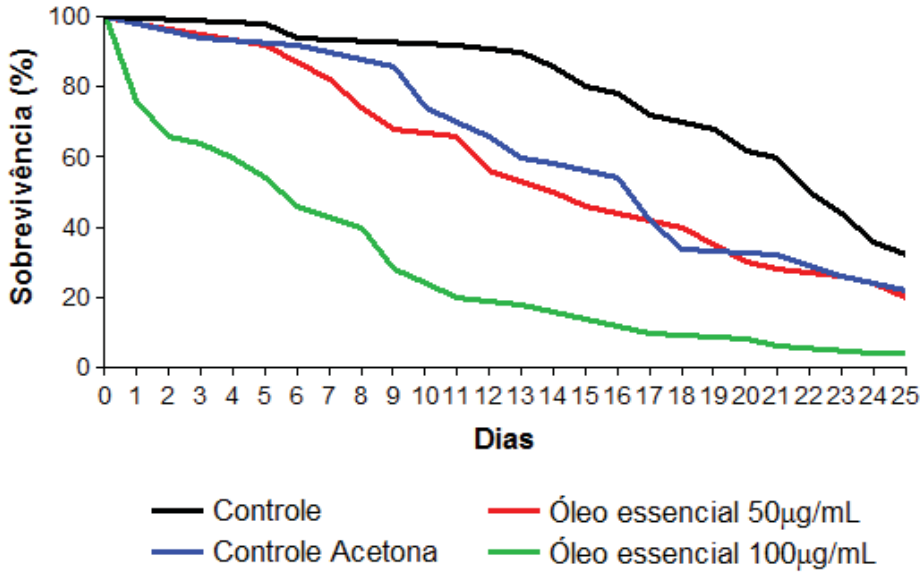


Figura 17: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio tópico com óleo essencial de *Duguetia lanceolata*, nas concentrações de 50 µg/µL e 100 µg/µL.

Tabela 11: Mortalidade acumulada e sobrevivência média (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio tópico com óleo essencial de *Duguetia lanceolata*, nas concentrações de 50 µg/µL e 100 µg/µL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	0	0	6	6	6	14	28	40	68	22***a***
Controle Acetona	0	0	6	8	12	26	42	58	68	78	17***b***
Óleo Essencial (50µg/mL)	2	2	2	8	26	32	50	58	72	80	14,5***a***
Óleo Essencial (100µg/mL)	24	34	36	54	60	76	82	90	94	96	6***b***

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" (p< 0,05).

A planta *Magonia pubescens* apresentou toxicidade para as formigas. No entanto, devido à polaridade dos extratos, não foi possível realizar a coluna a vácuo, o que impediu a continuação dos testes. Ainda assim, seu caule apresentou boa atividade contra as formigas, nos experimentos realizados em laboratório.

Em relação à *Duguetia lanceolata*, alguns materiais também se mostraram tóxicos para as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Em todos os testes de partições líquido-líquido, as maiores porcentagens de mortalidade obtidas foram das partições que haviam sido feitas com os solventes hexano e diclorometano.

Das subfrações de *D. lanceolata*, nota-se que a única que apresentou um bom resultado foi a amostra feita com metanol e água.

Os esteroides isolados da planta não tiveram atividade, independente de sua concentração. Pode ser, no entanto, que isso tenha acontecido pela baixa concentração, decorrente da pouca quantidade de material disponível para os testes.

Os testes foram realizados a partir do extrato hexânico de *Duguetia lanceolata*. É provável que os resultados fossem mais representativos com o extrato diclorometânico, que veio apresentando resultados melhores desde o início, na maioria dos testes. Para isso, no entanto, seria necessário maior quantidade de material do que foi possível extrair.

Uma pesquisa realizada por Bueno (2002) utilizou métodos semelhantes aos deste trabalho, porém com a planta *Cedrela fissilis*, da família Meliaceae. A pesquisadora utilizou extratos brutos hexânicos, diclorometânicos e metanólicos de raízes e folhas de *C. fissilis*, que apresentaram valores significativos na mortalidade de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* quando presentes na concentração de 2 mg/mL. Houve o fracionamento dos extratos brutos hexânicos e diclorometânicos, tanto das raízes quanto das folhas e foi comprovado o efeito tóxico para todas estas frações. As frações obtidas através dos extratos hexânicos das raízes e das folhas proporcionaram mortalidade de 50% das formigas no oitavo dia de experimento. As frações obtidas através dos extratos diclorometânicos das raízes e das folhas apresentaram mortalidade de metade das formigas no sétimo dia.

O óleo essencial de *Duguetia lanceolata*, cujos testes foram feitos por aplicação tópica, apresentou atividade em sua maior concentração (100 µg/µL), cuja mortalidade de 50% das formigas ocorreu no sexto dia de experimento.

Em testes tópicos realizados com extratos de *Ricinus communis* (família Euphorbiaceae), por Bigi (1994), foram observados resultados semelhantes ao do presente trabalho. A pesquisadora utilizou as frações hexano, diclorometano-1, diclorometano-2,

acetato de etila e metanol. Para cada uma destas frações, ela realizou três tratamentos, sendo eles: 20, 100 e 200 µg/formiga, da solução criada a partir de extrato e solvente. Para as frações hexano, diclorometano-1 e diclorometano-2, os tratamentos de 100 µg/formiga e de 200 µg/formiga, apresentaram toxicidade, enquanto o tratamento de 20 µg/formiga teve resultados semelhantes ao controle. Para a fração acetato de etila, os tratamentos de 20 µg/formiga e 100 µg/formiga proporcionaram maior porcentagem de mortalidade que o tratamento de 200 µg/formiga. Já a fração metanol provocou um abaixamento das porcentagens de sobrevivência em todas as concentrações, evidenciando boa toxicidade do extrato, principalmente na concentração mais alta, em que a mortalidade total de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* ocorreu entre 13 e 14 dias do experimento.

5 CONCLUSÕES

Tanto *Magonia pubescens*, quanto *Duguetia lanceolata* apresentaram alguns resultados promissores. No entanto, para que se conheça melhor o potencial tóxico destas duas plantas, se fazem necessários mais testes.

No que diz respeito à *D. lanceloata*, os bioensaios foram realizados com o extrato hexânico e não com o diclorometânico, cujos resultados foram mais representativos. Desta forma, é provável que os testes apresentassem resultados melhores se as partições diclorometânicas fossem utilizadas.

6 RESUMO

As formigas cortadeiras, pertencentes aos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, possuem esse nome pelo hábito que têm de cortar as folhas das plantas. Por este motivo, elas causam danos econômicos, principalmente em áreas de cultura agrícola. Para realizar o controle dessas pragas, existem inúmeros métodos; porém, os únicos que apresentam resultados satisfatórios são os que utilizam inseticidas tradicionais. O controle químico pode gerar efeitos maléficos ao ambiente, à fauna e à população humana. É por isso que há uma grande procura por métodos alternativos, utilizando produtos que tenham grande especificidade e sejam passíveis de rápida degradação, sendo, portanto, menos danosos ao ambiente. Uma destas alternativas é a utilização de produtos naturais presentes nos vegetais superiores, que podem constituir novas fontes de material com ação tóxica para estes insetos praga. Este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade das plantas *Magonia pubescens* e *Duguetia lanceolata* para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Para os testes, as formigas foram divididas em lotes de 50 operárias, distribuídas em 5 placas para cada tratamento e mantidas em B.O.D. durante os 25 dias do experimento. Nos bioensaios de ingestão, os extratos provenientes das plantas foram incorporados em dieta artificial e testados durante 25 dias. No bioensaio tópico, as substâncias eram colocadas no pronoto das formigas e era oferecida dieta pura em todos os dias do experimento. Após os testes, os dados foram transferidos para o software Prisma 3.0, para a confecção de curvas de sobrevivência e para a realização das análises estatísticas. Apesar de *Magonia pubescens* apresentar um bom resultado, não foi possível continuar com os testes, pois a alta polaridade dos extratos impossibilitava a separação das substâncias. Para *Duguetia lanceolata*, os melhores resultados obtidos foram das partições líquido-líquido que tinham como solventes o hexano e o diclorometano, além do óleo essencial na concentração de 100 μg/μL.

Palavras-chave: Formigas. Controle. Produtos naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDOR, R.W. Inseticides. In: C.R.A. GODFREY (Ed.). **Agrochemicals from natural products,** New York: Marcle Dekker, p.1-62, 1994.

AERTS, T.J.; BARRY, T.N.; MCNABB, W.C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agriculture, Ecosystems and Environment,** v.75, p.1-12, 1999.

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

ANJOS, N.; MOREIRA, D.D.O.; DELLA-LUCIA, T.M.C. Manejo integrado de formigas cortadeiras em reflorestamentos. In: DELLA-LUCIA, T.M.C. (Ed.). **As formigas cortadeiras.** Viçosa: Editora Folha de Viçosa, p.212-226, 1993.

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

ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G.M.C.; SILVA, I.G. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.36, p.17-25, 2003.

BARRER, P. M.; CHERRETT, J. M. Some factors affecting the site and patterns of leaf-cutting activity in the ant *Atta cephalotes* L. **Journal of Entomology Series A**, v.1, n.47, p. 15-27, 1972.

BERENBAUM, M.R. North American ethnobotanicals as sources of novel plant-based insecticides. In: ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. (Ed.). **Inseticides of plant origin,** Washington: ACS, p.11-24, 1989.

BIGI, M.F.M.A. **Efeito de extratos orgânicos foliares de *Ricinus communis* L. sobre operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 [Hymenoptera, Formicidae].** 1994. 111f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro. 1994.

BLANTON, C. M., EWEL, J. J. Leaf-cutting ant herbivory in successional and agricultural tropical ecosystems. **Ecology**, v.66, n.3, p. 861-869, 1985.

BOARETTO, M.A.C.; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF.** São Paulo, v.11, n.30, p.1-47, 1997.

BRANDÃO, C. R. F.. MAYHÉ-NUNES, A. J. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v.38, n.3B, p. 639-665, 2001.

BRASIL. **Programa Nacional de Eliminação do Brometo de Metila.** Disponível em: <http://www.unep.fr/ozonaction/information/mmcfiles/6272-p-eliminacao_do_brometo_de_metila.pdf> Data de Acesso: 03/08/2012

BROWN JR., W. L. Diversity of ants. In: AGOSTI, D. et al. (Ed). **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity,** Princeton: Smithsonian Institution. p. 45-79, 2000.

BUENO, F.C. **Toxicidade de extratos da planta *Cedrela fissilis* Vell. para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae).** 2002. 70f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2002.

BUENO, F.C. **Seleção de ingredientes ativos para uso em iscas no controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae).** 2005. 98f. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas – Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2005.

BUENO, O.C.; BUENO, F.C.,; BROCHINI, J.; SINHORI, K.; MORINI,M.S.C.; HEBLING, M.J.A.; PAGNOCCA, F.C.; LEITE, A.C.;VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B. Activity of sesame leaf extracts to the leaf-cutting ant Atta sexdens rubropilosa (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology,** v.44, n.3, p.599-606, 2004.

BUENO, O.C. et al. Effect of sesame (*Sesamum indicum*) on nest development of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Jornal of Applied Enomology.** Berlim, v.119, p.341-343, 1995.

BUENO, O. C. et al. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, n.1, p. 107-113, 1997.

CHERRETT, J. M., SEAFORTH, C. E. Phytochemical arrestants for the leaf-cuntting ants, *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich), with some notes on the ants response. **Bulletin of Entomological Research**, v.59, p. 615-625, 1970.

CHERRETT, J.M. Some factors involved in the selection of vegetable substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in tropical rain forest. **Journal of Animal Ecology**, London, 41: 647-660, 1972.

CHERRETT, J.M. History of the leaf-cutting ant problems. In: LOFGREN, C.S. & VANDER MEER, R.K. (Ed.). **Fire ants and leaf-cutting ants:** biology and management. Boulder, Westview Press, p.10-17, 1986.

CURRIE, C.R.; STUART, A.E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **The Royal Society**. v. 268, p.1033-1039, 2001.

DELABIE, J.H.C. *Atta silvai* Gonçalves, sinônimo de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.41, n.2-4, p.339-341, 1998.

DELLA LUCIA, T.M.C.; BENTO, J.M.S. Vôo nupcial ou revoada. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed). **As formigas cortadeiras.** Viçosa: Folha de Viçosa, p. 54-59, 1993.

DELLA LUCIA, T.M.C.; FOWLER, H.G. As formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras.** Viçosa: Folha de Viçosa, p.1-3, 1993.

DELLA LUCIA, T.M.C.; FOWLER, H.G.; ARAÚJO, M.S. As formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras.** Viçosa: Folha de Viçosa, p.43-48, 1993.

DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F. Métodos atuais de controle e perspectivas. In: **As formigas cortadeiras.** DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). Viçosa: Editora Folha de Viçosa, p.163-176, 1993.

DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.) **As formigas cortadeiras.** Viçosa: Sociedade de Investigação Florestal, 1993. 262p.

FARJI-BRENER, A.G.F. & A. RUGGIERO. Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhabiting Argentina: patterns in species richness and geographical range sizes. **Journal of Biogeography,** Oxford, 21 (4): 391-399, 1994.

FERNANDES, F.F; DALESSANDRO, W.B.; FREITAS, E.P.S. Toxicity of extract of *Magonia pubescens*(Sapindales: Sapindaceae) St. Hil. to Control the Brown Dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*(Latreille) (Acari: Ixodidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.37, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2008000200016> Data de Acesso: 01/12/2012.

FONTES, L. F., PENTENUCCI, W. Isca atrativa. **Divulgação agronômica**, Rio de Janeiro, n.32, p.4-6. 1972.

FORTI, L. C.; BOARETTO, M. A. C. **Formigas Cortadeiras:** biologia, ecologia, danos e controle. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1997. 61p.

FOWLER, H.G. Latitudinal gradients and diversity of the leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) (Hymenoptera, Formicidae). **Revista de Biologia Tropical**, v.31, p. 213-216, 1983.

FOWLER, H.G.; PEREIRA-DA-SILVA, V.; FORTI, L.C.; SAES, N.B. Population dynamics of leaf-cutting ants: a brief review. In: LOFGREN, C.S.; VANDER MEER, R.K. (Ed.). **Fire ants and leaf-cutting ants:** biology and management. Boulder: São Francisco & Oxford Westview Press, p.123-145, 1986.

FOWLER, H.G. Organização e regulação social em formigas. **Ethologica**, v.5, p.235-247, 1988.

GODFREY, C.R.A. Fungicides and bactericides. In: C.R.A. GODFREY (Ed.). **Agrochemicals from natural products,** New York: Marcle Dekker, p. 311-339, 1994.

GONÇALVES, C.R. O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym., Formicidae). **Studia Entomologica,** Petrópolis, 4 (1-4): 113-180, 1961.

GONÇALVES, C. R. Nota sobre a sistemática de *Atta sexdens* (L., 1758) e de suas subespécies (Hymenoptera: Formicidae). **Boletim fitossanitário**, v.9, p.1-3, 1963.

HEBLING-BERALDO, M. J. A.; BUENO, O. C.; ALMEIDA, R. E.; SILVA, O. A. Influência do tratamento com folhas de *Sesamum indicum* sobre o metabolismo respiratório de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). Separata de: **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil,** Rio Claro, v.20, n.1, p.27-33, 1991.

HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; SILVA, O.A. da; MAROTI, P.S. Toxic effects of *Canavalia ensiformis* L. (Leguminosae) on laboratory colonies of *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Applied Entomology,** Berlim, 124: 33-35, 2000.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Berlin: Springer – Verla, 1990.

HOWARD, J. J. et al. Toxity of terpenoid deterrents to the leaf-cutting *Atta cephalotes* and its mutualistic fungus. **Journal of Chemical Ecology,** New York. v.14, p.59-69, 1988.

HUBBELL, S.P.; WIEMER, D.F. Host plant selection by an Attini ant. In: JAISSON, P. (Ed.). **Social insects in the tropical.** Paris: University of Paris Presse, v.2, p.133-134, 1983.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, Guildford. v.19, p.603, 2000.

JACOBSON, M. Botanical pesticides: present and future. In: ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. (Ed.). **Inseticides of plant origin,** Washington: ACS, p.1-9, 1989.

JUSTI Jr. et al. Formigas cortadeiras. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, São Paulo, n.4, 1996.

KERMARRECA, C. A.; DECHARME, M.; FEBVAY, G. Leaf cutting ant symbiotic fungi: a synthesis of recent research. In: DELLA LUCIA, T. M. C. et al. **As Formigas Cortadeiras**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1993.

LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. M. Variability in the selection of substrate by the leaf-cuttting ants *Atta* and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bulletin of Entomological Research**, v.65, p.33-47, 1975.

LITTLEDYKE, M, CHERRETT, J. M. Defense mechanisms in young and old leaves against cutting by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.68, p.263-270, 1978.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Do tannins in leaves of trees and shrubs from African and Himalayan regions differ in level and activity? **Agroforest Systems,** v.40, p.59-68, 1998.

MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo: Ceres, 1970. 167p.

MONTEIRO, M.R. et al. Activity of extracts and fatty acids of *Canavalia ensiformis* (Leguminosae) against the symbiotic fungus of the leaf-cutting *Atta sexdens*. **Anais da Academia Nacional de Ciências,** v.70, n.4, p.733-736, 1998.

MORINI, M.S.C.; BUENO, O.C.; BUENO, F.C.; LEITE, A.C.; HEBLING,M.J.A.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.;SILVA, M.F.G.F. DA Toxicity of sesame seed to leafcutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera:Formicidae). **Sociobiology,** v.45, p.195-204, 2005.

MUELLER, U.G. et al. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Quarterly Review of Biology,** New York. v.76, p.169-197, 2001.

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

MULLENAX, C.H. The use of jackbean (*Canavalia ensiformis*) as a biological control for leaf-cutting ants (*Atta* spp.). **Biotropical,** Washington. v.11, n.4, p.313-314, 1979.

NASCIMENTO, G.N.L. **Investigação do potencial tóxico do extrato bruto etanólico das sementes de *Annona coriacea* Mart. (Araticum) em camundongos subcronicamente expostos.** 2008. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

NORTH, R.D.; JACKSON, C.W.; HOWSE, P.E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. **Tree,** Canberra, v.12, n.10, p.386-389, 1997.

NORTH, R.D.; JACKSON, C.W.; HOWSE, P.E. Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate for the fungus. **Physiological Entomology,** Oxford, v.24, p.127-133, 1999.

OLIVEIRA, M.A.; DELLA LUCIA, T.M.C.; ANJOS, N. Ocorrência e densidade de ninhos de formigas cortadeiras em plantios de eucalipto no sua da Bahia. **Revista Brasileira de Entomologia,** Dordrecht, Holanda. v.2, n.1/2, p.17-21, 1998.

PAES, J.B.; MORAIS, V.M.; LIMA, C.R. Resistência natural de nove madeiras do semiárido brasileiro a fungos causadores da podridão-mole. **Revista Árvore,** v.29, n.3, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622005000300003> Acesso: 28/08/2012.

PAGNOCCA, F.C. et al. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic of leaf-cutting ants. **Bulletin Entomology Research,** Farnham Royal. v.80, p.349-352, 1990.

PAGNOCCA, F.C.et al. Toxicity of lignans to the symbiotic fungus of leaf cutting ants. **Journal of Chemical Ecology,** v.22, n.7, p.1325-1329, 1996.

PERREIRA, R.C.; DELLA LUCIA, T.M.C.; MAYHÉ-NUNES, A.J. Levantamento de Attini (Hymenoptera: Formicidae em povoamentos de *Eucalyptus grandis* W Hill ex Maiden em Minas Gerais. **Revista Árvore,** Viçosa. v.23, n.3, p.341-349, 1999.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L). **Ecological Entomology,** London, v. 4, p.151-169, 1979.

RAMOS, L.S. et al. Impacto das capinas mecânica e química do sub-bosque de *Eucalyptus grandis* sobre a comunidade de formigas (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore,** Viçosa. v.28, n.1, p.139-146, 2003.

ROCKWOOD, L. L. Plant selection and foraging patterns in two species of leaf-cutting ants (*Atta*). **Ecology**, v.57, n.1, p.48-61, 1976.

ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local,** v.1, n.2, p.43-50, 2001.

SANTOS, B.M.; MORALES-PAYAN, J.P.; STALL, W.M. Tolerance of cilantro (*Coriandrum sativum* L.) to postemergence herbicides. **Proceedings of the Caribbean Food Crops Society**, 33: 333-339, 1997.

SCHULTZ, T.R. Ants, plants and antibiotics. **Nature,** Londres. v.398, n.29, p.747-748, 1999.

SHULTZ, T.R. et al. Reciprocal illumination: A comparison of agriculture of humans and in fungus-growing ants. In: VEGA, F.; BLACKWELL, M. (Ed.) **Insect-Fungas Association:** Ecology and Evolution. New York: Oxford University Press, p.149-190, 2005.

STRADLING, D.J.; POWELL, R.J. Fungiculture and the choice of substrates by attini ants. In: BILLEN, J. (Ed.). **Biology and evolution of social insects,** Bélgica: Leuven University Press, p.133-143, 1992.

STRADLING, D.J. An introduction to fungus growing ants, Attini. In: HUXLEY, C.R.; CUTLER, D.F. **Ant plant interactions,** Oxford, Oxford University Press, p.15-18, 1991.

TAKAHASHI-DEL-BIANCO, M. **Toxicidade de extratos orgânicos foliares de *Canavalia ensiformis* L. e de alguns princípios ativos de inseticidas comerciais para operárias de *Atta sexdens* L., 1758 (Hymenoptera: Formicidae), isoladas do formigueiro.** 2002. 174f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

VIEGAS Jr., C.V. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova,** São Paulo, v.26, n.3, p.390-400, 2003.

VILELA, E.F. Status of leaf-cutting ant control in Forest plantations in Brazil. In: LOFGREN, C.S.; VANDER MEER, R.K. (Ed.). **Fire ants and leaf-cutting ants:** biology and management. Boulder, Westview Press, p.399-408, 1986.

WEBER, N. A. Northern extent of Attine ants (Hymenoptera: Formicidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v.72, p. 414-415, 1970.

WILLIAMS, D. F. Overview. In: VANDER MEER, R. K.; JAFFE, F.; CEDENO, A. (Ed.). **Applied Myrmecology:** a world perspective, Boulder: São Francisco & Oxford Westview Press, p.493-495, 1990.

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