FABIANA CORREA BUENO

SELEÇÃO DE INGREDIENTES ATIVOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE ISCAS TÓXICAS PARA O CONTROLE DE FORMIGAS-CORTADEIRAS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Maria Izabel Camargo Mathias

Rio Claro

2013

FORMIGAS

Homem malvado, o que te fizemos?
Por que nos persegues com chama e veneno?
Embora alguma lá do tronco de embaúba
Com a venenosa picada talvez te derruba,
Somos nós uma colônia pacífica e calma,
Não fazemos mal a nenhuma pobre alma.
Tarde e cedo,
Com empenho, trabalhamos sem medo.
Temos folhas a cortar,
Caminhos por fazer e cargas a levar,
Tratar os filhotes e construir o ninho,
Não temos tempo de olhar os vizinhos!
E agora vens com água envenenada nas mãos
E em nosso ninho puseste fogo e aflição,
Destruíste o que em semanas erguemos,
Homem malvado, o que te fizemos?
O quê vocês fizeram? Escutem, vou lhes contar.
Muito me agrada vê-las dedicadas, a carregar,
Mas não deveriam as minhas plantas devorar.
Junto ao riacho há folhas e flores mimosas,
Grama e ervas de espécies volumosas,
O bastante para vocês e suas filhotinhas;
Mas não satisfazem suas línguas daninhas!
Tarde e cedo,
Trabalho sem medo,
Semeio, planto e cultivo a minha terra,
E, inutilmente, gasto suor sem reserva.
Mal uma folhinha nova nascia,
Logo era ceifada e desaparecia.
Uma jovem arvorezinha plantei
E com seu crescimento me alegrei.
E hoje volto ao lugar de partida
E aí está minha árvore, desfolhada e despida.
Perdeu-se todo o meu cuidado e trabalho,
Restando apenas um único galho.
E olhe, lá estão vocês, unidas,
E mordem em duas as folhinhas compridas
E carregam, muito dispostas,
Os pedacinhos sobre as costas
E os levam embora. Eu as sigo no carreiro
E encontro, finalmente, o formigueiro.
Vocês querem arruinar a minha plantação;
Mas, sem perdão, todas sumirão

História Natural de Sonhos (1859) - poemas infantis de Fritz Müller.
Tradução de Lia Carmen Puff e Dennis Radünz (Editora Nauemblu, 2004).

Ao meu pai, Odair Correa Bueno, pela convivência diária e aprendizado profissional.

Dedico

AGRADECIMENTOS

► À Prof.ª Dr.ª Maria Izabel Camargo Mathias pela orientação, confiança e amizade.

► À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo no período de julho de 2009 a março de 2010.

► À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo no período de abril de 2010 a junho de 2013 (Processo 2009/17443-7).

► À Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, Instituto de Biociências, em especial ao Departamento de Biologia e ao Centro de Estudos de Insetos Sociais pelo acesso aos laboratórios.

► À Seção de Pós-graduação do Instituto de Biociências pelo auxílio eficiente e essencial.

► À Necis Miranda de Lima, pelo apoio e compreensão nos momentos mais urgentes. E, claro, pelo carinho e amizade!

► Aos colegas Alexsandro Santana Vieira, Gabriela Ortiz, Itamar Cristina Reiss, Marcela Ceccato e Pâmela Decio pelo auxílio no desenvolvimento da parte prática deste trabalho.

► Aos meus pais Odair e Sônia, por acreditarem nos meus sonhos e pela oportunidade de concretizá-los.

► Ao meu marido Felipe Silveira pela compreensão e companheirismo.

► Aos meus irmãos Luciano e Adriana por estarem sempre ao meu lado.

► Aos meus sobrinhos Leonardo e Lara por tornarem meus dias mais felizes.

RESUMO

Desde 2009, quando a sulfluramida foi incluída no anexo B da Convenção de Estolcomo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes, há uma procura por ingredientes ativos substitutos para uso em iscas no controle de formigas-cortadeiras no Brasil. Considerando que os ingredientes ativos responsáveis pela inibição da respiração celular dos insetos têm apresentado resultados satisfatórios no controle de formigas, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos do diafentiurom e do tolfenpyrad em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, por meio de bioensaios toxicológicos e da análise morfológica do ventrículo, dos túbulos de Malpighi e das glândulas pós-faríngeas para o desenvolvimento de iscas tóxicas. Os ingredientes ativos dissolvidos em acetona e em uma solução de acetona + óleo de soja foram incorporados em dieta artificial nas concentrações 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL. Para a realização dos bioensaios, operárias com massa corpórea entre 15 a 25 mg foram distribuídas em lotes de 50 formigas para cada tratamento, divididas em grupos de 10 e mantidas em 5 placas de Petri. Para cada ingrediente ativo, foram montadas duas baterias de testes, uma para análise de toxicidade e outra para análise morfológica. As placas foram colocadas em estufa para B.O.D com temperatura de 24ºC $\pm$ 1ºC e umidade relativa acima de 70%. A bateria relativa à análise de toxicidade foi examinada diariamente para anotação da mortalidade durante um período de 25 dias. Para a análise morfológica, 5 operárias de cada tratamento foram coletadas no 4º dia de experimento, dissecadas e os órgãos removidos foram fixados e processados para inclusão em historesina. As secções histológicas foram coradas com Hematoxilina–Eosina e fotodocumentadas em fotomicroscópio Motic BA 300. De acordo com os resultados obtidos nos testes de toxicidade, o diafentiurom nas concentrações 5.000 µg/g (0.5%), 10.000 µg/g (1%) e 50.000 µg/g (5%) e o tolfenpyrad nas concentrações 500 µg/g (0.05%), 1.000 µg/g (0.1%) e 5.000 µg/g (0.5%) foram incorporados em iscas e testados em colônias incipientes mantidas em laboratório. As operárias alimentadas diariamente com dieta contendo diafentiurom a partir da concentração 5 µg/mL e tolfenpyrad em todas as concentrações testadas apresentaram redução significativa na sobrevivência em relação aos controles, principalmente para os ingredientes ativos dissolvidos em óleo de soja. As análises ao microscópio de luz revelaram alterações morfológicas nas glândulas pós-faríngeas, no ventrículo e nos túbulos de Malpighi das operárias tratadas com diafentiurom e tolfenpyrad. Entretanto, as iscas contendo diafentiurom e tolfenpyrad não foram eficientes no controle das colônias incipientes de *A. sexdens rubropilosa*.

Palavras-chave: Controle de formigas-cortadeiras. Inibidor da respiração celular. Diafentiurom. Tolfenpyrad.

ABSTRACT

Since 2009 when sulfluramid was listed in annex B of the Stockholm Convention's Persistent Organic Pollutants, effort has been made to search for other active ingredients to use in baits for controlling leaf-cutting ants in Brazil. Considering active ingredients that inhibit insect cellular respiration have been shown to be effective in controlling ants, the current work aimed at assessing the effects of diafenthiuron and tolfenpyrad to *Atta sexdens rubropilosa* workers through toxicological bioassays and morphological analysis of the ventricle, Malpighian tubules and the post-pharyngeal glands to develop toxic baits with new active ingredients. Diafenthiuron and tolfenpyrad were dissolved in acetone and in a solution of acetone + soy oil then incorporated in artificial diet at concentrations of 1 μg/mL, 5 μg/mL, 10 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL, 500 μg/mL and 1000 μg/mL. Workers with body mass between 15 and 25 mg were distributed in 50 ants for each treatment, divided into groups of 10 and maintained in 5 Petri dishes. For each active ingredient, two test batteries were performed, one for analysis of toxicity and other for morphological analysis. The Petri dishes were placed in a BOD incubator at 24 º C ± 1 º C and relative humidity above 70%. The battery of toxicity analysis was examined daily for mortality annotation over a period of 25 days. For morphological analysis, five workers from each treatment were collected on the 4th day, dissected and removed organs were fixed and processed for inclusion in historesin. Histological sections were stained with hematoxylin-eosin and documented in light microscope Motic BA 300. According to toxicity tests, diafenthiuron in concentrations of 5.000 μg/g (0.5%), 10.000 μg/g (1%) and 50.000 μg/g (5%) and tolfenpyrad in concentrations of 500 μg/g (0.05%), 1.000 μg/g (0.1%) and 5.000 μg/g (0.5%) were incorporated into baits and tested in incipient colonies. The treatments where ants were daily fed on the diet containing diafenthiuron from the concentration 5 μg/mL and tolfenpyrad at all concentrations tested, especially those dissolved in soy oil, exhibited high mortality in comparison to the controls. Light microscopy revealed morphological alterations in the ventricle, Malpighian tubules and post-pharyngeal glands of workers treated with diafenthiuron and tolfenpyrad. However, the baits containing diafenthiuron and the baits containing tolfenpyrad were not efficient to control the colonies of leaf-cutting ants.

Keywords: Leaf-cutting ant control. Inhibitor of cellular respiration. Diafentiuron. Tolfenpyrad.

SUMÁRIO

página

1. INTRODUÇÃO 10
2. REVISÃO DA LITERATURA 12
2.1. Formigas-cortadeiras 12
2.2. Importância econômica das formigas-cortadeiras 13
2.3. Métodos atuais de controle de formigas-cortadeiras 14
2.4. Controle de formigas-cortadeiras com iscas tóxicas 17
2.5. Sistema digestório de formigas 22
2.6. Sistema excretor de formigas 23
2.7. Glândulas pós-faríngeas 25
3. MATERIAL E MÉTODOS 27
3.1. Testes "in vitro" com operárias de *Atta sexdens rubropilosa* 27
3.1.1. Origem das formigas utilizadas 27
3.1.2. Dieta artificial 28
3.1.3. Bioensaios para determinação da toxicidade e análise morfológica 28
3.1.3.1. Bioensaios para determinação da toxicidade 29
3.1.3.2. Biensaios para análise morfológica 31
3.2. Testes com iscas em colônias mantidas em laboratório 32
3.2.1. Origem e manutenção das colônias 32
3.2.2. Preparação das iscas 32
3.2.3. Avaliação das iscas 33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 35
4.1. Toxicidade para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* 35
4.1.1. Diafentiurom 35
4.1.2. Tolfenpyrad 39
4.2. Análise morfológica – Microscopia de luz 44
4.2.1. Glândulas pós-faríngeas 44
4.2.2. Ventrículo 44
4.2.3. Túbulos de Malpighi 46
4.3. Avaliação de iscas em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório 55
4.3.1. Diafentiurom 55
4.3.1.1. Aceitação das iscas 55

4.3.1.2. Intoxicação das formigas 56
4.3.1.3. Corte de folhas 56
4.3.1.4. Mortalidade de formigas 56
4.3.1.5. Corte de fungo 56
4.3.1.6. Mudança de panela de fungo 57
4.3.1.7. Redução no jardim de fungo 57
4.3.1.8. Rainha morta 57
4.3.1.9. Presença de fungos filamentosos 57
4.3.1.10. Condições das colônias 57
4.3.2. Tolfenpyrad 58
4.3.2.1. Aceitação das iscas 58
4.3.2.2. Intoxicação das formigas 59
4.3.2.3. Corte de folhas 59
4.3.2.4. Mortalidade de formigas 60
4.3.2.5. Corte de fungo 60
4.3.2.6. Mudança de panela de fungo 61
4.3.2.7. Redução no jardim de fungo 61
4.3.2.8. Rainha morta 61
4.3.2.9. Presença de fungos filamentosos 61
4.3.2.10. Condições das colônias 61
5. CONCLUSÕES 63
6. REFERÊNCIAS 64

1. INTRODUÇÃO

Presentes em quase todos os habitats da Terra, as mais de 12 mil espécies de formigas desempenham importantes atividades, atuando na estabilidade do ambiente, nas condições do solo, na polinização das plantas e na dispersão das sementes (AGOSTI; JOHNSON, 2013; BROWN Jr., 2000; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Entretanto, quando o ambiente é alterado, principalmente pela atividade humana, esses insetos podem tornar-se pragas.

Entre as espécies economicamente importantes, as formigas-cortadeiras, pertencentes aos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, destacam-se devido ao desfolhamento que causam nas plantas. Estas formigas atacam a maioria das monoculturas, onde cortam e transportam fragmentos vegetais para seus ninhos, cultivando o fungo simbionte, *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Möller), que constitui a base de alimentação da colônia.

Alguns métodos mecânicos, culturais e biológicos são empregados no manejo, mas nem todos apresentam critérios de utilização bem definidos e adequadamente mensuráveis. Assim, o controle químico, apesar de algumas limitações, ainda é o método mais utilizado por apresentar tecnologia disponível para aplicação em escala comercial (ARAÚJO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2011).

O controle químico de pragas de plantas cultivadas, entre as quais se incluem as formigas-cortadeiras, sempre foi uma das principais preocupações ecológicas devido aos efeitos maléficos causados pelos agrotóxicos sobre o ambiente, o homem e outros animais (WILLIAMS, 1990). Em consequência disso, tem ocorrido um aumento no número de pesquisas que objetivam substituir os agrotóxicos tradicionais por outros de degradação rápida, de maior especificidade e menos danosos ao ambiente (MORINI et al., 2005). Outro aspecto importante e pouco analisado é a otimização do uso dos ingredientes ativos atuais, conhecendo o modo de ação de cada um deles, a concentração mais adequada e a melhor forma de atingir o alvo (BUENO, 2005a).

A maioria das estratégias de controle químico causa a morte das formigas-cortadeiras por contato, o que não é suficiente para o controle da população em uma determinada área. O controle eficiente envolve a eliminação da colônia como um todo e não de apenas alguns indivíduos. Atualmente, o uso de iscas tóxicas é o método mais adequado, pois as iscas são incorporadas no ciclo alimentar da colônia e permitem a ação do inseticida por ingestão (LOECK; NAKANO, 1984; NAGAMOTO et al., 2004).

Desde a proibição do uso do dodecacloro em 1993, a sulfluramida passou a ser o ingrediente ativo mais utilizado na confecção de iscas tóxicas no Brasil. Entretanto, no ano de

2009, o ácido perfluorooctano sulfônico, utilizado na produção da sulfluramida, foi incluído no anexo B da Convenção de Estolcomo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes com restrições de produção e uso somente para o controle de formigas-cortadeiras no Brasil até que um ingrediente ativo substituto seja encontrado (STOCKHOLM CONVENTION, 2009).

No desenvolvimento de iscas tóxicas eficientes e economicamente viáveis para o controle de formigas, é fundamental que o ingrediente ativo apresente ação lenta para que as operárias vivam o suficiente para distribuí-lo a outras formigas, aja por ingestão, não cause repelência às operárias, seja letal em baixas concentrações e seja ambientalmente aceito (BUENO; CAMPOS-FARINHA, 1999; ETHERIDGE; PHILLIPS, 1976; FORTI et al., 1993). Análises toxicológicas recentes de ingredientes ativos empregados no controle de pragas em geral revelaram que os inibidores da respiração celular apresentam tais características para uso em iscas no controle de formigas-cortadeiras (BUENO et al., 2013; CECCATO, 2010; DECIO et al., 2013; NAGAMOTO et al., 2004).

Apesar de haver inúmeros trabalhos avaliando a atividade tóxica de ingredientes ativos em formigas, poucos relatam as alterações morfológicas provocadas nos órgãos desses insetos (DÉCIO et al., 2013; SUMIDA et al., 2010). O ventrículo e os túbulos de Malpighi estão relacionados, respectivamente, com a absorção e a excreção de compostos químicos e a avaliação da morfologia desses órgãos pode revelar alterações ultra estruturais induzidas por substâncias tóxicas (BRAECKAMAN et al., 1999; HABES et al., 2006; SOROUR, 2001). De acordo com Sumida et al. (2010), o ingrediente ativo absorvido pelo intestino e não excretado adequadamente pelos túbulos de Malpighi pode permanecer na hemolinfa e, indiretamente, interferir em glândulas que absorvem os precursores dos produtos glandulares a partir da hemolinfa. Assim, as glândulas pós-faríngeas, realizam intensa síntese dos produtos glandulares e podem também apresentar alterações morfológicas induzidas pela presença de agentes tóxicos na hemolinfa.

Considerando que os ingredientes ativos responsáveis pela inibição da respiração celular dos insetos são os que apresentam resultados satisfatórios no controle de formigas-cortadeiras, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do diafentiurom e do tolfenpyrad em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, por meio de bioensaios toxicológicos e da análise morfológica do ventrículo, dos túbulos de Malpighi e das glândulas pós-faríngeas para o desenvolvimento de iscas tóxicas com novos ingredientes ativos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Formigas-cortadeiras

As formigas pertencentes à tribo Attini, subfamília Myrmicinae, família Formicidae caracterizam-se por serem simbiontes obrigatórias de fungos específicos que servem de alimentos para elas. Compreendem 297 espécies dentro de 16 gêneros (BOLTON, 2003, 2006; BRANDÃO et al., 2011), dos quais *Atta* Fabricius, 1804 (saúvas) e *Acromyrmex* Mayr, 1865 (quenquéns) representam as formigas cortadeiras de folhas, cultivando seu fungo predominantemente sobre fragmentos vegetais frescos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

A tribo Attini é endêmica do Novo Mundo e ocorre desde o norte-leste dos Estados Unidos (40°N) (RABELING et al., 2007) até a Argentina (41°S) (FARJI-BRENER; CORLEY, 1998). Especificamente, o gênero *Atta* está distribuído entre as latitudes 32°N e 33°S e o gênero *Acromyrmex* entre as latitudes 34°N e 41°S (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2009). Com exceção do Chile e do Caribe, as formigas-cortadeiras podem ser encontradas tanto em ambientes nativos quanto em áreas antropizadas, principalmente de uso intenso por atividades agrícolas ou mesmo em ambientes estritamente urbanos (DELABIE et al., 2011).

No Brasil, a espécie *Atta sexdens* é considerada a mais amplamente distribuída e a que causa maiores prejuízos às lavouras (GONÇALVES, 1963), composta de três subespécies: *A. sexdens sexdens* Linnaeus, 1758, *A. sexdens rubropilosa* Forel, 1908 e *A. sexdens piriventris* Santschi, 1919. A subespécie *A. sexdens rubropilosa*, conhecida popularmente como "saúva limão", está distribuída nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Goiás e Paraná (ANJOS et al., 1998; KEMPF, 1972) e é bastante estudada pelo fato de ser a maior responsável por danos na agricultura e em reflorestamentos de eucalipto (MARICONI, 1970).

Segundo Brandão et al. (2011), a ausência de revisões recentes sobre a taxonomia da maioria dos Attini torna a identificação das espécies tarefa difícil até mesmo para os especialistas, inclusive no caso de *Atta* e *Acromyrmex*, que possuem suas espécies entre as mais citadas na literatura, porém, muitas vezes os espécimes testemunhos não são depositados em coleções tornando impossível na prática a associação da informação publicada a determinada espécie.

2.2. Importância econômica das formigas-cortadeiras

O fato das formigas-cortadeiras atacarem muitas espécies vegetais resulta em grandes prejuízos, não só pela competição por esses produtos com o homem e seus animais domésticos (AMANTE, 1972), como também pela preferência desses insetos para a utilização de plantas cultivadas (CHERRETT, 1968). Além disso, o efeito pode ser indireto, em decorrência da contaminação ambiental pelos agrotóxicos utilizados no seu controle (DELLA LUCIA; FOWLER, 1993; DELLA LUCIA; SOUZA, 2011).

A capacidade de colonização e forrageamento dessas formigas aliada ao desequilíbrio ecológico provocado pelo desmatamento e a introdução de monoculturas agrícolas e florestais propiciaram condições ideais de proliferação e o estabelecimento de suas colônias, o que levou a caracterizá-las como pragas (CHERRETT, 1986a).

As formigas-cortadeiras representam uma das principais pragas da Região Neotropical, principalmente na América do Sul, e são responsáveis por danos econômicos em reflorestamentos (ANJOS et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1998; PEREIRA et al., 1999; VASCONCELOS; CHERRETT, 1997; VILELA, 1986), na agricultura (CHERRETT; PEREGRINE, 1976, CHERRETT, 1986a,b,c; MARICONI, 1970) e em pastagens (AMANTE, 1967; FOWLER et al., 1986).

Uma das principais causas de fracasso na condução de reflorestamentos é a presença de formigas-cortadeiras. Ao contrário de outras pragas, elas ocorrem o ano inteiro, atacam florestas de todas as idades e, quando não controladas, impedem a sobrevivência de qualquer tipo de planta (ANJOS et al., 1998). Os prejuízos causados pela atividade de *A. sexdens rubropilosa*, para uma densidade de quatro colônias/ha foram calculados em 14% para plantações de eucalipto e em 14.5% para plantações de pinos (AMANTE, 1972). Com relação à produção de madeira, a presença de mais de 30 colônias de *Atta laevigata* Smith, 1858 por hectare em plantações de pinos pode reduzir em até 50% o volume de madeira produzido (HERNÁNDEZ; JAFFÉ, 1995) e, em plantações de eucalipto, o desfolhamento de 100% das árvores causa redução de 45% da produção de madeira (FREITAS; BERTI FILHO, 1994).

A densidade de colônias dessas formigas pode aumentar de 5 a 10 vezes quando florestas tropicais são convertidas em áreas de pastagens ou campos agrícolas (MOUTINHO, 1995). Segundo Amante (1967), 10 sauveiros adultos/ha cortam 21 quilos de forragem por dia, reduzindo em mais de 50% a capacidade de pastagem. Além dos danos diretos, cujas estimativas são praticamente inexistentes, podem provocar danos indiretos como a erosão do solo ao redor dos formigueiros em desenvolvimento, a possibilidade de causarem danos

físicos aos animais e aos equipamentos mecânicos e a possível redução no valor das terras de pastagens infestadas (DELLA LUCIA, 1999).

Os prejuízos provocados pelo ataque de formigas-cortadeiras em cultivos de cana-de-açúcar também são de grande magnitude. Nesse tipo de monocultura, a presença de um único sauveiro adulto de *Atta bisphaerica* Forel, 1908 por hectare pode provocar a perda de 3.6 toneladas de cana-de-açúcar por ano. Isso significa, aproximadamente, 450 Kg de açúcar ou 300 litros de álcool perdidos. Contudo, na maioria das vezes, há mais de um sauveiro por hectare, elevando o prejuízo para aproximadamente 50 t/ha em todo o ciclo da cana (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011; DOW AGROSCIENCES, 1998).

Além dos prejuízos ocasionados na área agrícola, Mariconi (1970) também se refere às formigas-cortadeiras causando danos às construções (prédios, represas, pontes e túmulos), bem como nas estradas de rodagem e de ferro pelo fato das galerias e panelas poderem ceder ao peso das paredes de uma casa ou de outra construção.

De acordo com Fowler et al. (1990) e Della Lucia (2003), muitos desses cálculos podem estar super ou subestimados, sendo difícil identificar a verdadeira magnitude dos prejuízos. Ainda assim, são inegáveis as perdas ocasionadas por estas formigas, relatadas desde o século XVI no Brasil (MARICONI, 1970).

2.3. Métodos atuais de controle de formigas-cortadeiras

Em razão de sua importância econômica, as formigas-cortadeiras têm sido alvo das mais diversas tentativas de controle que incluem desde as receitas caseiras, que passam de geração em geração, até recursos de alta tecnologia, tudo isso sem grande sucesso (DELLA LUCIA; VILELA, 1993).

Vários métodos culturais, mecânicos, físicos, biológicos e químicos têm sido estudados para o controle de formigas-cortadeiras, sendo que alguns deles podem ser utilizados para o controle de colônias iniciais e são viáveis, principalmente, em pequenas propriedades. Entretanto, desde os anos 50, com o desenvolvimento dos inseticidas sintéticos, os métodos químicos têm sido efetivamente utilizados no controle destes insetos (OLIVEIRA et al., 2011).

O controle cultural pode ser realizado através de métodos de aração e gradagem do solo para formigueiros com até quatro meses de idade, pois, nesta fase, a única câmara da colônia ainda se localiza a aproximadamente 20 centímetros de profundidade do solo e há

grande probabilidade das lâminas do equipamento atingirem a rainha e matá-la (DELLA LUCIA; VILELA, 1993; OLIVEIRA et al., 2011). Porém, para formigueiros adultos, o efeito pode ser prejudicial, uma vez que a mecanização do solo pode desestruturar parcialmente a colônia, cessando temporariamente sua atividade, dando a falsa impressão de que foi controlada e dificultando sua localização (FORTI; BOARETTO, 1997).

Outro método de controle cultural que tem sido empregado é o uso de culturas armadilhas na borda da cultura principal. Essas plantas podem ser atrativas ou provocarem efeitos tóxicos ou repelentes para as formigas-cortadeiras, desviando-as da cultura principal por algum tempo (DELLA LUCIA; VILELA, 1993; FORTI; BOARETTO, 1997).

O controle mecânico de formigas-cortadeiras consiste na escavação dos formigueiros até que a rainha seja localizada e morta. É uma alternativa razoável em pequenas áreas sempre que os ninhos estiverem superficiais, ou seja, com até quatro meses de idade, pois a partir dessa fase a rainha localiza-se a uma profundidade superior a 1.5 metros (DELLA LUCIA; VILELA, 1993). Na prática, este método é inviável em áreas de plantios comerciais, em reflorestamentos e sistemas de pastagens devido à grande extensão das áreas e ao tamanho dos formigueiros (FORTI; BOARETTO, 1997).

O uso de barreiras para proteger a copa das plantas é um método de controle físico muito antigo e um dos mais utilizados em pomares para se evitar o ataque das formigas, sendo que cones plásticos invertidos e tiras plásticas cobertas com graxa ou vaselina colocados nos troncos das árvores são as barreiras mais utilizadas. Este é um método eficiente, porém, vistorias e reparos constantes devem ser feitos para que a proteção das árvores seja prolongada (JUSTI Jr. et al., 1996).

O controle biológico com predadores, parasitóides e micro-organismos patogênicos é importante na regulação das populações de formigas-cortadeiras, principalmente, durante o período da revoada e da fundação de novas colônias. Os inimigos naturais juntamente com as condições ambientais são responsáveis pelo controle de 99.95% das rainhas, antes mesmo que elas tenham fundado suas colônias (FORTI; BOARETTO, 1997). No entanto, a introdução de inimigos naturais no ambiente, sejam eles microrganismos, outros invertebrados e vertebrados ainda não pode ser visualizada como estratégia de controle para as formigas-cortadeiras devido aos poucos estudos nesta área. Ainda assim, o controle biológico deve ser sempre lembrado como técnica dentro da filosofia do manejo integrado de pragas e algumas medidas como restrição à caça de animais e ao uso de produtos fitossanitários e plantação de vegetação nativa entre a cultura principal são importantes para a preservação dos inimigos naturais das formigas (DELLA LUCIA; VILELA, 1993; ZANETTI et al., 2000).

O controle químico, apesar de várias restrições, é o único que apresenta tecnologia disponível para ser utilizado em larga escala comercial no controle de formigas-cortadeiras. As estratégias de controle químico diferem, principalmente, pelo tipo de formulação e modo de aplicação dos inseticidas.

Os formicidas pós são formulados em veículos sólidos à base de clorpirifós, deltametrina, malation ou fention e aplicados com equipamento manual denominado polvilhadeira. A morte das formigas ocorre pelo contato direto com o produto, que é aplicado nos olheiros visando atingir o interior do formigueiro. Apesar de muito utilizado, esse método apresenta fortes limitações de uso, como a necessidade de remoção da terra solta 24 a 48 horas antes da aplicação, a baixa penetração do produto nas câmaras de ninhos adultos dada a sua complexidade estrutural e a aderência do produto às paredes dos canais dos ninhos devido à umidade, prejudicando sua eficiência. Além disso, apresenta riscos elevados para o ambiente e para o aplicador (DELABIE, 1989; OLIVEIRA et al., 2011).

A termonebulização implica na produção de uma fumaça tóxica, a partir da queima de óleo diesel ou querosene que fornece a veiculação do formicida. A aplicação se dá diretamente nos orifícios sobre o monte de terra solta através de equipamentos denominados termonebulizadores. Geralmente o método de aplicação mais utilizado é por saturação, ou seja, a fumaça é injetada num dos orifícios, aguardando-se sua saída pelos demais orifícios e, quando a fumaça torna-se densa, os orifícios são fechados. O método apresenta desvantagens operacionais e econômicas, sendo a manutenção de equipamentos um dos maiores entraves à sua viabilidade. Além disso, apresenta alto risco de intoxicação para os trabalhadores e necessita de pessoal treinado para operar o equipamento. Entretanto, destaca-se como um método eficiente para o controle de grandes ninhos em áreas extensas, sendo atualmente uma das formas mais empregadas no controle de formigas-cortadeiras (ANJOS et al., 1998; DELLA LUCIA; ARAÚJO, 2000; FORTI; BOARETTO, 1997; OLIVEIRA et al., 2011).

A isca tóxica consiste na mistura de um ingrediente ativo dissolvido em óleo de soja e incorporado a um substrato atrativo, geralmente polpa cítrica desidratada, prensados na forma de pellets. Os pellets são distribuídos próximos às trilhas de forrageamento, sendo, posteriormente, transportados pelas próprias formigas para o interior da colônia. Trata-se de um método eficiente, prático e econômico, embora apresente limitações de uso em dias chuvosos e em áreas muito extensas, bem como a possibilidade de intoxicação de animais silvestres. No entanto, isto pode ser minimizado com a escolha correta da forma de aplicação. No Brasil, os ingredientes ativos registrados para uso em iscas no controle de formigas-

cortadeiras são o fipronil, o clorpirifós e a sulfluramida (DELLA LUCIA; ARAÚJO, 2000; FORTI; BOARETTO, 1997; OLIVEIRA et al., 2011).

2.4. Controle de formigas-cortadeiras com iscas tóxicas

A isca tóxica ideal para o controle de formigas deve apresentar as seguintes características: 1) ser atrativa às formigas, se possível a certa distância do ninho; 2) ser carregada sempre que encontrada; 3) ter ação lenta o suficiente para ser conduzida para longas distâncias; 4) ser distribuída amplamente pela colônia antes que apareçam os primeiros sintomas de intoxicação; 5) apresentar especificidade às espécies alvos; 6) apresentar baixa toxicidade aos vertebrados; 7) permanecer efetiva em condições adversas e; 8) conter um ingrediente ativo biodegradável (BUENO; CAMPOS-FARINHA, 1999; ETHERIDGE; PHILLIPS, 1976; FORTI et al., 1993).

Apesar de ser um método relativamente prático, o emprego de iscas tóxicas deve ser feito com muito critério e requer uma série de conhecimentos para a obtenção de resultados satisfatórios. Para tal, é muito importante realizar a vistoria da área a ser tratada para localizar os formigueiros e identificar as espécies de formigas presentes (ANJOS et al., 1993).

Uma vez localizado o formigueiro e constatado que a colônia está ativa, a área de terra solta deve ser medida para o estabelecimento da dose de isca, multiplicando-se a maior largura pelo maior comprimento do monte de terra solta. Embora o estabelecimento da dose de isca por unidade de área seja um método empírico, não há outra alternativa até o presente momento. As doses recomendadas pelos fabricantes para o controle de saúvas variam de 6 a 10 g/m^2 de terra, de acordo com o modo de ação e a concentração do ingrediente ativo. Para quenquéns, a dose recomendada é de 10 gramas por ninho (FORTI; BOARETTO, 1997).

As iscas podem ser aplicadas a granel ou em pequenos recipientes, denominados porta-iscas ou micro-porta-iscas, em função da quantidade de isca presente na embalagem. As iscas a granel devem ser aplicadas diretamente das embalagens, sem o contato manual, ao lado do maior número de trilhas que possuem olheiros ativos, próximos ao murundu. No entanto, os porta-iscas ou micro-porta-iscas devem ser distribuídos sistematicamente sobre a área, sem levar em consideração o local em que cada formigueiro está situado, evitando a necessidade de localização e medição dos ninhos (ANJOS et al., 1993).

Uma vez transportadas para o interior do ninho, as iscas que contêm um ingrediente ativo de ação lenta são distribuídas uniformemente por toda a colônia, sendo fragmentadas e

lambidas pelas operárias por repetidas vezes (MOREIRA et al., 2003; PRETTO; FORTI, 2000). Em um período entre 6 e 8 horas as iscas já estão totalmente fragmentadas e são incorporadas no jardim de fungo, onde sofrem hidratação, incham e se fragmentam ainda mais em pedaços muito pequenos, impossibilitando sua remoção (FORTI; BOARETTO, 1997).

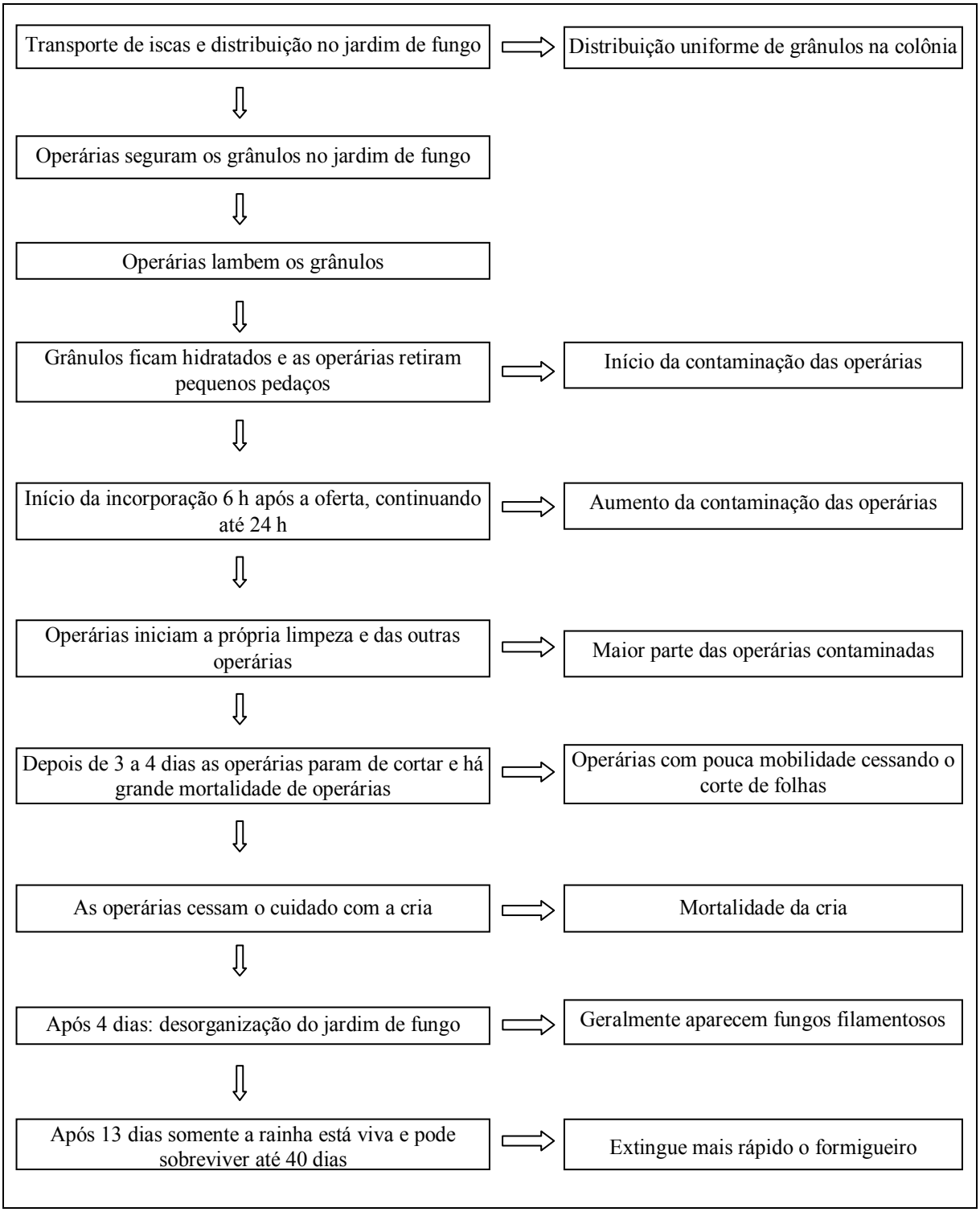


Figura 1: Processamento de iscas tóxicas contendo ingrediente ativo de ação lenta em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* (modificado de FORTI; BOARETTO, 1997).

A partir de 24 horas do contato com as iscas, aproximadamente 50% das operárias já estão contaminadas. Essa contaminação ocorre por ingestão direta do ingrediente ativo durante o processamento da isca e através da limpeza individual e coletiva das operárias na tentativa de remover pequenos fragmentos de iscas de seus corpos. A trofalaxia ocorre com uma frequência muito baixa entre as operárias e, portanto, não deve ser considerada como fator responsável pela contaminação (ANDRADE et al., 2002; BUENO et al., 2008).

As operárias generalistas e jardineiras são as que se contaminam mais rápido devido à atividade que desempenham na limpeza em geral e no cuidado com o fungo. Com a crescente mortalidade das operárias ocorre uma desorganização geral da colônia e o jardim de fungo deixa de ser cuidado, facilitando a contaminação por microrganismos e, consequentemente, o formigueiro é extinto em poucos dias (Figura 1) (FORTI; BOARETTO, 1997).

Na preparação de iscas tóxicas eficientes e economicamente viáveis para o controle de formigas é fundamental conhecer a qualidade e a forma de ação dos ingredientes ativos. Além de ser de ação lenta e rapidamente degradável quando exposto ao ambiente, o ingrediente ativo deve atender outros requisitos básicos como: não apresentar efeito repelente, agir mesmo quando em baixas concentrações, ter ação cumulativa por ingestão e apresentar baixa toxicidade aos mamíferos (BUENO; CAMPOS-FARINHA, 1999; ETHERIDGE; PHILLIPS, 1976; FORTI et al., 1993).

Análises toxicológicas recentes da ação de compostos utilizados no controle de pragas em geral foram realizadas com o piriproxifen (BUENO, 2005a), a hidrametilnona (BUENO et al., 2013; DECIO et al., 2013), a rotenona (CECCATO, 2010), o ácido bórico (SUMIDA et al., 2010), o fipronil e a sulfluramida (TAKAHASHI-DEL-BIANCO, 2002; NAGAMOTO, 2003) em busca de novos ingredientes ativos para o controle de formigas-cortadeiras e os que se mostraram promissores para uso em iscas foram os inibidores da respiração celular sulfluramida, hidrametilnona e rotenona.

Os inibidores da respiração celular têm sido utilizados no manejo de ácaros em diversas culturas, devido à sua eficiência no controle e ao seu mecanismo de ação diferenciado. Atuam em diversas etapas da respiração celular comprometendo, principalmente, a geração de energia (adenosina tri-fosfato - ATP) e são divididos de acordo com o seu provável modo de ação (CORBETT et al., 1984; DEKEYSER, 2005; IRAC, 2012):
► Inibidores da ATP sintase mitocondrial: as moléculas afetam a função dessa enzima, mas não é claro se isso é o que provoca a atividade biológica. Os ingredientes ativos que possuem esse modo de ação são o diafentiurom, os organoestâmicos (azociclotina, cihexatina e óxido de fembutatina), o propargito e a tetradifona.

► Desacopladores da fosforilação oxidativa via disrupção do gradiente de próton H: os translocadores de prótons entram em curto circuito no gradiente de prótons mitocondrial de modo que o ATP não possa ser sintetizado. O clorfenapir, o DNOC e a sulfluramida possuem esse modo de ação.

► Inibidores do transporte de elétrons no complexo I: inibem o complexo I da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, impedindo a utilização de energia pela célula. Os inseticidas e acaricidas do sub grupo químico METI (fenazaquin, fenpiroximato, pyrimidifen, piridabem, tebufenpirade e tolfenpyrad) e a rotenona (Derris) atuam no complexo I.

► Inibidores do transporte de elétrons no complexo II: inibem o complexo II da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, impedindo a utilização de energia pela célula. No momento, apenas o cyenopyrafen e o cyflumetofen possuem esse modo de ação.

► Inibidores do transporte de elétrons no complexo III: inibem o complexo III da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, impedindo a utilização de energia pela célula. Os ingredientes ativos que possuem esse modo de ação são a hidrametilnona, o acequinocil e o fuacrypyrim.

► Inibidores do transporte de elétrons no complexo IV: inibem o complexo IV da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, impedindo a utilização de energia pela célula. Os sub grupos químicos fosfina (fosfeto de alumínio, fosfeto de cálcio, fosfeto de zinco e fosfina) e cianeto (cyanide) atuam no complexo IV.

Os ingredientes ativos diafentiurom e tolfenpyrad analisados no presente trabalho estão caracterizados a seguir. As informações básicas foram obtidas do Compendium of Pesticide Common Names (2013) e das monografias depositadas na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2013).

Nome comum: Diafentiurom/ Diafenthiuron

Sinonímia: CGA - 106630

Número CAS: 80060-09-9

Nome químico: 1-tert-butyl-3-(2,6-di-isopropyl-4-phenoxyphenyl) thiourea

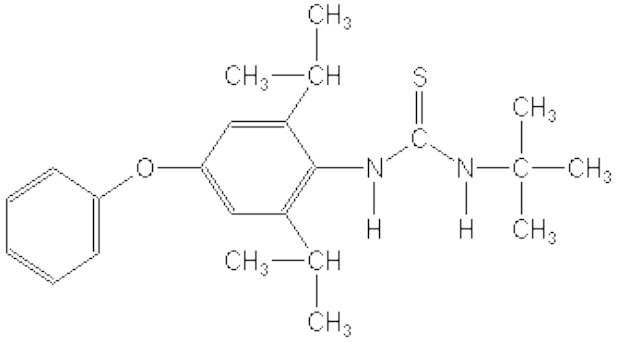
Fórmula molecular: $C_{23}H_{32}N_2OS$

Grupo Químico: Feniltiouréia

Classe: Acaricida e inseticida

Classificação toxicológica: Classe III (mediamente tóxico)

Modalidade de emprego no Brasil: Uso agrícola autorizado para aplicação foliar nas culturas de algodão, café, citros, feijão, melancia, melão, repolho, rosa, soja e tomate.

Fórmula Estrutural: 

Solubilidade a 25º C: água = 0.06 mg/L, acetona = 43 g/L e em tolueno, n-hexano 9.6, octanol-n-26 = 330 g/L.

Nome comum: Tolfenpyrad

Sinonímia: ---

Número CAS: 129558-76-5

Nome químico: 4-chloro-3-ethyl-1-methyl-*N*-[4-(*p*-tolyloxy)benzyl]pyrazole-5-carboxamide

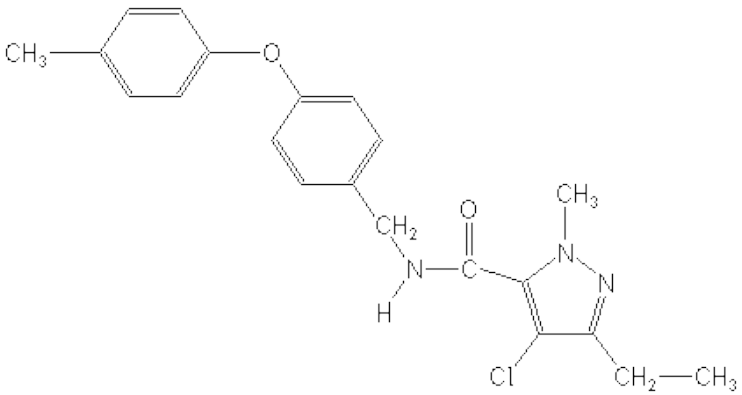
Fórmula molecular: $C_{21}H_{22}ClN_3O_2$

Grupo Químico: Pirazol

Classe: Inseticida

Classificação toxicológica: Não possui monografia na ANVISA

Modalidade de emprego no Brasil: Não possui monografia na ANVISA e, portanto, seu uso ainda não é permitido no Brasil.

Fórmula Estrutural: 

Solubilidade a 25º C: água = 0.0087 mg/L, em hexano = 7.41 g/L, em tolueno = 366 g/L e em metanol = 59,6 g/L.

2.5. Sistema digestório de formigas

O sistema digestório das formigas adultas é semelhante ao encontrado em outros insetos e está dividido em 3 regiões: intestino anterior (estomodeo), intestino médio (ventrículo) e intestino posterior (proctodeo). Os intestinos anterior e posterior têm origem ectodérmica e o intestino médio, endodérmica. Tais regiões podem apresentar-se anatômica ou fisiologicamente modificadas de acordo com a função específica e hábitos alimentares desenvolvidos por cada espécie (CAETANO; OVERAL, 1984; CAETANO; CRUZ-LANDIM, 1983; CHAPMAN, 1975; JANET, 1902; RICHARDS; DAVIES, 1977; ROSS, 1965; SNODGRASS, 1935; TOMOTAKE, 1996; WIGGLESWORTH, 1974).

No presente trabalho, o enfoque está direcionado ao ventrículo, principal região do trato digestório responsável pela absorção dos produtos da digestão, entre outras funções (CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999).

Segundo Caetano (1977), o ventrículo é a região do trato digestório que apresenta maior variação histológica. Seu epitélio inicia-se em continuação ao da válvula cardíaca, onde terminam as partes de origem ectodérmica ou estomodeal e inicia-se a parte de origem endodérmica. Esta transição constitui uma zona especial, que alguns autores atribuem à função de formar a membrana peritrófica nos insetos que a possuem (CAETANO, 1981). Esta membrana contém quitina e protege as células epiteliais contra atritos do alimento (principalmente do tipo sólido) e microrganismos presentes no trato digestório, regula o fluxo de enzimas da célula para a luz do ventrículo e também regula os produtos da digestão no caminho inverso (CHAPMAN, 1975, 1985; RICHARDS; RICHARDS, 1977; SMITH, 1968; WIGGLESWORTH, 1974).

O ventrículo possui basicamente dois tipos de células, as digestivas e as regenerativas. As células digestivas, denominadas também de células colunares, principais ou enterócitos, constituem o epitélio ventricular, apresentam-se em grande número e são muito longas. Essas células realizam múltiplas funções que envolvem a absorção e o armazenamento de produtos orgânicos e inorgânicos e a secreção da membrana peritrófica e de enzimas e glicoproteínas (CAETANO, 1977; MARTOJA; BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984).

Há três regiões na célula digestiva que podem ser reconhecidas morfologicamente: apical, mediana e basal. A região apical é geralmente recoberta por microvilosidades, mas algumas vezes a membrana plasmática forma uma série de lamelas. As células dessa região apresentam retículo endoplasmático rugoso, lisossomos, além de grânulos de secreção, vesículas de micropinocitose e microfilamentos procedidos de microvilosidades do

citoesqueleto, formando uma rede terminal de actina. A região mediana contém células com núcleos, retículos endoplasmáticos rugosos, complexos golgianos, mitocôndrias e grânulos imaturos de secreção (CRUZ-LANDIN, 1985). Algumas estruturas lisossomais aparecem em abundância, consistindo de corpos densos e vacúolos heterofágicos em quantidade variável (PRIESTER, 1971). A região basal apresenta mitocôndrias ligadas a dobras da membrana plasmática, indicando possível envolvimento com transporte de água e íons. As células dessa região possuem grânulos com organização lamelar concêntrica, principalmente na parte posterior do ventrículo (CAVALCANTE; CRUZ-LANDIN, 1999). Esses grânulos, também chamados de esferocristais (OLAVARRIETA, 2000), podem estocar e absorver íons (BILLINGSLEY; DOWNE, 1989) para serem lançados dentro do conteúdo do intestino e, após um período de acúmulo, podem esvaziar ou aparentemente desaparecer como uma consequência da utilização dos conteúdos estocados (CHAPMAN, 1985).

As células regenerativas apresentam um citoplasma relativamente pequeno, com abundantes ribossomos livres e pequeno número de outras organelas (CHAPMAN, 1985). Podem ser encontradas isoladas ou reunidas em grupos de células diminutas na base do epitélio ventricular e são responsáveis pela reposição das células do intestino médio, substituindo células velhas ou com danos funcionais (MARTOJA; BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984).

2.6. Sistema excretor de formigas

Os túbulos de Malpighi, principal órgão excretor dos insetos, são responsáveis por manter o meio interno ionicamente constante e assim, tornar as atividades celulares mais eficientes. Excretam amônia, ácido úrico e outros catabólitos, além de vários íons, como cálcio e potássio (MARTINELLI, 1998). Além disso, são capazes de segregar substâncias presentes no sangue e reabsorver componentes úteis ao organismo (CAETANO, 1988; CHAPMAN, 1975; GILLOTT, 1980; MELLO, 1979; WIGGLESWORTH, 1974).

Nas formigas, os túbulos de Malpighi estão distribuídos entre a região de inserção do ventrículo e do intestino posterior e se apresentam como filamentos simples, delgados e longos, de fundo cego, com a região distal livre da hemocele (CAETANO, 1988). A exceção ocorre para o gênero *Solenopsis* (lava-pés), onde a extremidade distal fica aderida à parede do reto (CAETANO et al., 2002).

Transversalmente, os túbulos de Malpighi apresentam-se como anéis formados de três a oito células, dependendo da espécie (CAETANO, 1981; CAETANO; MACHADO, 1982; CHAPMAN, 1975; MARTINELLI; TABOGA, 1993). Em formigas, são dotados de fibras musculares, dispostas helicoidalmente, que aumentam o contato da hemocele com a hemolinfa e cuja função mais provável seja promover o fluxo do conteúdo do lúmen (CAETANO et al., 2002). As células epiteliais que constituem os túbulos estão unidas por junção do tipo *gap* (MARTOJA; BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984). No entanto, podem ocorrer outras estruturas de adesão como desmossomos (MARTINELLI, 1998). Além da função aderente das junções, estas também podem permitir a passagem de moléculas de peso molecular variável desde a hemolinfa até o lúmen dos túbulos (BRADLEY, 1985).

A região basal das células dos túbulos de Malpighi apresenta numerosas invaginações da membrana plasmática que estão ligadas à lâmina basal por contatos focais (MARTINELLI, 1998). As invaginações aumentam a superfície de contato da membrana para o transporte de íons e água para o interior das células. Na região apical existem microvilosidades alongadas que aumentam a superfície de transporte de água e íons entre o citoplasma e o lúmen. Ambas podem estar associadas a mitocôndrias, indicando alta demanda energética para o transporte de substâncias entre a hemolinfa e o lúmen dos túbulos (BRADLEY, 1985; MARTOJA; BALLAN - DUFRANÇAIS, 1984).

Os túbulos de Malpighi das formigas são bastante uniformes. Apresentam uma única camada de células cúbicas ou piramidais, entretanto, há diferenças nos detalhes estruturais das células em espécies diferentes e também ao longo de um único túbulo (SMITH, 1968).

Por meio de testes histoquímicos e análise de microscopia eletrônica, Martinelli (1998) observou que os túbulos de *A. sexdens rubropilosa* são divididos em três regiões: proximal, distal e intermediária. A região proximal apresenta aspectos ultra-estruturais relacionados à síntese protéica intensa, representada por complexos de Golgi, porções de retículo endoplasmático rugoso extremamente desenvolvidas e grande quantidade de ribossomos livres. Além disso, apresenta grande acúmulo de cálcio e ausência de grânulos mineralizados. A região distal apresenta características típicas de células transportadoras de íons, com grande quantidade de mitocôndrias distribuídas na célula, além de grande quantidade de grânulos mineralizados (esferocristais). Finalmente, a região intermediária apresenta características de ambas as regiões citadas. Sendo assim, a região proximal apresenta células com características secretoras (de proteínas ou substâncias lipídicas) (OLAVARRIETA, 2000) e a região distal apresenta células com características excretoras. Segundo Wigglesworth (1974), há evidências de que pode ocorrer reabsorção na região proximal dos túbulos.

A origem embriológica dos túbulos de Malpighi é controversa. Para Mohamed (1986), os túbulos possuem origem ectodérmica, entretanto, para Chapman (1975) e Tsai (1993) a origem é endodérmica.

2.7. Glândulas pós-faríngeas

Até certo tempo atrás, as glândulas pós-faríngeas eram exclusivas dos Formicidae, independente de casta ou sexo (DELAGE-DARCHEN, 1976; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; WHEELER, 1926). Entretanto, recentemente, essas glândulas foram descritas em algumas espécies de vespas (STROHM et al., 2007; STROHM et al., 2010).

As formigas apresentam um par de glândulas pós-faríngeas que se localizam dorsalmente na transição entre a faringe e o esôfago (CAETANO, 1998; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Elas são de origem ectodérmica e formam-se durante o desenvolvimento pós-embrionário a partir de duas evaginações dorsais do epitélio faringeal (CRUZ-LANDIM; MOTA, 1990; GAMA, 1985; JANET, 1905).

Em *A. sexdens rubropilosa*, as glândulas pós-faríngeas apresentam a mesma constituição anatômica e ultramorfológica tanto para as rainhas como para as operárias, sendo maiores nas primeiras (BUENO, 2005). São formadas por dois cachos de lobos ramificados, os quais terminam em uma estrutura sacular que se estreita em um canal levemente quitinizado e desemboca na parte inicial do intestino anterior. Os lobos são achatados e se espalham na região frontal do cérebro, localizando-se entre o cérebro e a tampa quitinosa da cabeça (ALMEIDA-TOLEDO, 1967). As paredes dos lobos são formadas por um epitélio simples de células achatadas ou cilíndricas com reentrâncias entre elas (BUENO, 2005). O núcleo é distinto e grande, enquanto que o citoplasma é rico em organelas, contém vesículas e possui granulações (ALMEIDA-TOLEDO, 1967). O lúmen é revestido internamente por cutícula (BILLEN; SCHOETERS, 1996).

As funções das glândulas pós-faríngeas são passíveis de discussão. Para Hölldobler e Wilson (1990), são fontes de alimento para a rainha e cria, corroborando com a proposta de Peregrine e Mudd (1974) sobre a transferência do conteúdo dessas glândulas entre os membros da colônia. Anteriormente, Ayre (1963) já havia observado a presença de nematóides parasitas no lúmem das glândulas, um indício da existência de material alimentar completo, o qual seria regurgitado para os demais membros da colônia (trofalaxia). Diante disso, concluiu que o conteúdo das glândulas pode ser um tipo de reserva alimentar para

operárias e larvas, porém que não parece estar associado à digestão. Finalmente, Febvay e Kermarrec (1986) detectaram baixa atividade enzimática de α-glucosidase e esterase nas glândulas de *Acromyrmex octospinosus*, sugerindo que elas não estão relacionadas à digestão.

A presença de lipídios no interior das glândulas pós-faríngeas tem sido observada em várias espécies de formigas. Para alguns autores, os lipídios teriam origem a partir do alimento ingerido e para outros, seriam resultados de secreções do próprio epitélio glandular. Phillips e Vinson (1980) observaram que não ocorre passagem de ácidos graxos e triglicerídios injetados na hemolinfa para o interior dessas glândulas em *Solenopsis invicta.* Diante disso, admitiram que os lipídios presentes no lúmen das glândulas deveriam ser originários do alimento ingerido. Vinson et al. (1980) também sugeriram que as glândulas pós-faríngeas atuam como cecos cefálicos em *S. invicta*, realizando a absorção de ácidos graxos e triglicerídios. Entretanto, Bagnères e Morgan (1991) verificaram que os hidrocarbonetos são predominantes entre os lipídios presentes no interior das glândulas de *S. invicta*, semelhantes àqueles encontrados na cutícula das operárias, com a função de reconhecimento específico e intra-colonial. Em vista disso, sugeriram que o papel nutritivo das glândulas fosse reavaliado. Fato também reforçado por Soroker et al. (1994), em formigas que apresentam altos níveis de trofalaxia.

Apesar das contradições apresentadas, as glândulas pós-faríngeas sempre apresentam lipídios em seu interior. Quando a quantidade de alimento ingerido é pequena, os compostos lipossolúveis e hidrossolúveis são separados na porção final da faringe, percorrendo caminhos distintos. Os lipídios se deslocam para as glândulas pós-faríngeas, onde são absorvidos, enquanto que os compostos hidrossolúveis vão para o papo e depois para o ventrículo. Entretanto, se a ingestão de lipídios for alta e as glândulas pós-faríngeas não forem capazes de armazená-los, estes passam pela faringe e pelo esôfago, atingindo o papo. Uma vez no papo, os lipídios não passam para o ventrículo e, após algum tempo, retornam para as glândulas pós-faríngeas (BUENO, 2005; BUENO et al., 2008; JESUS, 2006; PHILLIPS; VINSON, 1980).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Testes "in vitro" com operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

3.1.1. Origem das formigas utilizadas nos bioensaios

As operárias de *A. sexdens rubropilosa*, com massa corpórea variando de 15 a 25 mg, foram coletadas de formigueiros mantidos no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista – UNESP (Figura 2). Para a manutenção desses formigueiros, diariamente foram oferecidos folhas de *Eucaliptus* sp., flocos de aveia e, ocasionalmente, outras plantas palatáveis às saúvas como *Hibiscus* sp., *Ligustrum* sp. ou folhas e pétalas de roseiras.



Figura 2: Vista geral de formigueiro de *Atta sexdens rubropilosa* mantido no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP, Rio Claro / SP.

3.1.2. Dieta artificial

Para a manutenção das formigas isoladas do formigueiro foi utilizada uma dieta sólida, preparada com 5 g de glicose, 1 g de peptona bacteriológica, 0.1 g de extrato de levedura e 1.5 g de ágar bacteriológico, dissolvidos em 100 mL de água destilada (BUENO et al., 1997). A dieta foi aquecida em forno de micro-ondas para melhor solubilização e autoclavada a 120º C e 1 atm por 15 minutos. Em seguida foi vertida, ainda quente, em placas de Petri (10 cm de diâmetro), previamente esterilizadas em estufa a 180º C por 2 horas.

Após o resfriamento e a solidificação das dietas as placas foram embrulhadas em filme de PVC e mantidas em geladeira para evitar a contaminação por micro-organismos, sendo utilizadas nos dias subsequentes, durante o período do experimento (BUENO et al., 1997).

3.1.3. Bioensaios para determinação da toxicidade e análise morfológica

Os ingredientes ativos diafentiurom e tolfenpyrad foram pesadwos em balança analítica, dissolvidos em acetona ou em mistura de acetona e óleo de soja (9:1) e incorporados na dieta artificial ainda quente (logo após a retirada da autoclave).

Para cada ingrediente ativo foram realizados 3 bioensaios, sendo dois para a determinação da toxicidade e um para análise morfológica. Em todos os bioensaios, as formigas foram retiradas dos formigueiros e colocadas em placas de Petri (10 cm de diâmetro) forradas com papel filtro, sendo mantidas em estufa tipo B.O.D com temperatura de 24º ± 1º C e umidade relativa acima de 70%. Cada grupo experimental foi composto por 50 operárias distribuídas em 5 placas de Petri, totalizando 10 formigas por placa. A dieta para a manutenção das formigas ou a dieta acrescida de ingrediente ativo foi oferecida em papel alumínio na quantidade aproximada de 0.5 g/placa. A cada 24 horas a dieta foi renovada e o papel filtro foi trocado para evitar o desenvolvimento de microrganismos contaminantes (Figura 3) (BUENO et al., 1997).

Para a certificação de que os resultados obtidos não sofreriam influência do solvente utilizado, três grupos controles foram estabelecidos: o primeiro recebeu somente dieta artificial (controle dieta pura), o segundo recebeu dieta artificial com adição de acetona (controle acetona) e o terceiro recebeu dieta artificial com adição da mistura de acetona e óleo de soja na proporção 9:1 (controle acetona + óleo).



Figura 3. Operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento com o ingrediente ativo incorporado em dieta artificial.

3.1.3.1. Bioensaios para determinação da toxicidade

Os bioensaios permitiram a avaliação da toxicidade do diafentiurom e do tolfenpyrad através da retirada diária e anotação do número de formigas mortas durante um período de 25 dias. Além disso, também permitiram a observação do período inicial de intoxicação das operárias e a definição da menor concentração tóxica de cada ingrediente ativo a ser utilizada nos bioensaios de análise morfológica. Além dos grupos controle (dieta pura, acetona ou acetona + óleo), sete concentrações foram avaliadas para cada um dos ingredientes ativos (Tabela 1).

A análise gráfica foi realizada através da determinação das porcentagens acumuladas de formigas vivas por dia para cada tratamento. Posteriormente, a mediana do tempo de sobrevivência foi determinada e as curvas de sobrevivência foram comparadas por meio do teste não paramétrico "log rank", com nível de significância de 5% (ELANDT-JOHNSON et al., 1980), utilizando-se o software Graph-Pad, aplicativo Prisma 3.0.

Tabela 1. Bioensaios para a determinação da toxicidade do diafentiurom e do tolfenpyrad em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

BIOENSAIO I	
TRATAMENTO	**CONCENTRAÇÃO**
Controle dieta pura	---
Controle acetona	---
Diafentiurom dissolvido em acetona	1 µg/mL (0.0001%)
Diafentiurom dissolvido em acetona	5 µg/mL (0.0005%)
Diafentiurom dissolvido em acetona	10 µg/mL (0.001%)
Diafentiurom dissolvido em acetona	50 µg/mL (0.005%)
Diafentiurom dissolvido em acetona	100 µg/mL (0.01%)
Diafentiurom dissolvido em acetona	500 µg/mL (0.05%)
Diafentiurom dissolvido em acetona	1000 µg/mL (0.1%)
BIOENSAIO II	
TRATAMENTO	**CONCENTRAÇÃO**
Controle dieta pura	---
Controle acetona + óleo	---
Diafentiurom dissolvido em acetona + óleo	1 µg/mL (0.0001%)
Diafentiurom dissolvido em acetona + óleo	5 µg/mL (0.0005%)
Diafentiurom dissolvido em acetona + óleo	10 µg/mL (0.001%)
Diafentiurom dissolvido em acetona + óleo	50 µg/mL (0.005%)
Diafentiurom dissolvido em acetona + óleo	100 µg/mL (0.01%)
Diafentiurom dissolvido em acetona + óleo	500 µg/mL (0.05%)
Diafentiurom dissolvido em acetona + óleo	1000 µg/mL (0.1%)
BIOENSAIO III	
TRATAMENTO	**CONCENTRAÇÃO**
Controle dieta pura	---
Controle acetona	---
Tolfenpyrad dissolvido em acetona	1 µg/mL (0.0001%)
Tolfenpyrad dissolvido em acetona	5 µg/mL (0.0005%)
Tolfenpyrad dissolvido em acetona	10 µg/mL (0.001%)
Tolfenpyrad dissolvido em acetona	50 µg/mL (0.005%)
Tolfenpyrad dissolvido em acetona	100 µg/mL (0.01%)
Tolfenpyrad dissolvido em acetona	500 µg/mL (0.05%)
Tolfenpyrad dissolvido em acetona	1000 µg/mL (0.1%)
BIOENSAIO IV	
TRATAMENTO	**CONCENTRAÇÃO**
Controle dieta pura	---
Controle acetona + óleo	---
Tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo	1 µg/mL (0.0001%)
Tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo	5 µg/mL (0.0005%)
Tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo	10 µg/mL (0.001%)
Tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo	50 µg/mL (0.005%)
Tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo	100 µg/mL (0.01%)
Tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo	500 µg/mL (0.05%)
Tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo	1000 µg/mL (0.1%)

3.1.3.2. Bioensaios para análise morfológica

Baseando-se nos resultados obtidos nos bioensaios para a determinação da toxicidade, as menores concentrações dos ingredientes ativos que causaram intoxicação nas operárias no 4º dia de experimento foram selecionadas para a análise morfológica (DECIO et al., 2013).

As operárias foram alimentadas com dieta artificial durante três dias, sendo coletadas e dissecadas no 4º dia de experimento. Além dos grupos controle, dois tratamentos foram avaliados para cada um dos ingredientes ativos (Tabela 2).

Tabela 2. Bioensaios para a análise morfológica em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com diafentiurom e tolfenpyrad

BIOENSAIO I	
TRATAMENTO	**CONCENTRAÇÃO**
Controle acetona	---
Controle acetona + óleo	---
Diafentiurom dissolvido em acetona	500 µg/mL (0.05%)
Diafentiurom dissolvido em acetona + óleo	500 µg/mL (0.05%)
BIOENSAIO II	
TRATAMENTO	**CONCENTRAÇÃO**
Controle acetona	---
Controle acetona + óleo	---
Diafentiurom dissolvido em acetona	50 µg/mL (0.005%)
Diafentiurom dissolvido em acetona + óleo	5 µg/mL (0.0005%)

Para cada tratamento, cinco operárias de *A. sexdens rubropilosa* foram anestesiadas por resfriamento e dissecadas em solução salina 0.6% (cloreto de sódio e água destilada) com o auxílio de pinça e lâmina de barbear, sob um estereomicroscópio Leica MZ-APO.

O ventrículo, os túbulos de Malpighi e as glândulas pós-faríngeas foram retirados e fixados com paraformoldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0.1 M (pH 7.4) por 2 horas à temperatura ambiente, lavados no tampão fosfato de sódio 0.1 M (pH 7.4), desidratados em uma série crescente de alcoóis (70% a 95%) com duração de 15 minutos cada banho e, posteriormente, transferidos para a resina de embebição (*overnight*) a 4º C.

Após a embebição, os órgãos foram incluídos em historesina. Com o auxílio de um micrótomo, foram feitas secções histológicas de 3 µm de espessura, as quais foram coradas com hematoxilina-eosina (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983). Depois de secas, as lâminas contendo as secções foram cobertas com bálsamo do Canadá e lamínula. Posteriormente, o material foi analisado e documentado em fotomicroscópio Motic BA 300.

3.2. Testes com iscas em colônias mantidas em laboratório

3.2.1. Origem e manutenção das colônias

As colônias de *A. sexdens rubropilosa* foram coletadas na Fazenda Corumbataí, município de Corumbataí – São Paulo, Brasil (22º18'S e 47º39'W), em março de 2010 e março de 2011. Cada colônia foi acondicionada em recipiente plástico transparente de 1000 mL contendo uma camada de gesso no fundo para manter a umidade do jardim de fungo. Posteriormente, outros dois recipientes plásticos de 500 mL foram interligados ao primeiro por tubos plásticos transparentes, sendo um para fornecimento do substrato vegetal (câmara de forrageamento) e outro para deposição de lixo pelas formigas (câmara de lixo) (Figura 4).

As colônias foram mantidas em sala climatizada e abastecidas diariamente com folhas de *Eucaliptus* sp. e flocos de aveia até que o jardim de fungo atingisse o volume ideal (1000 mL de jardim de fungo) para a realização dos testes.

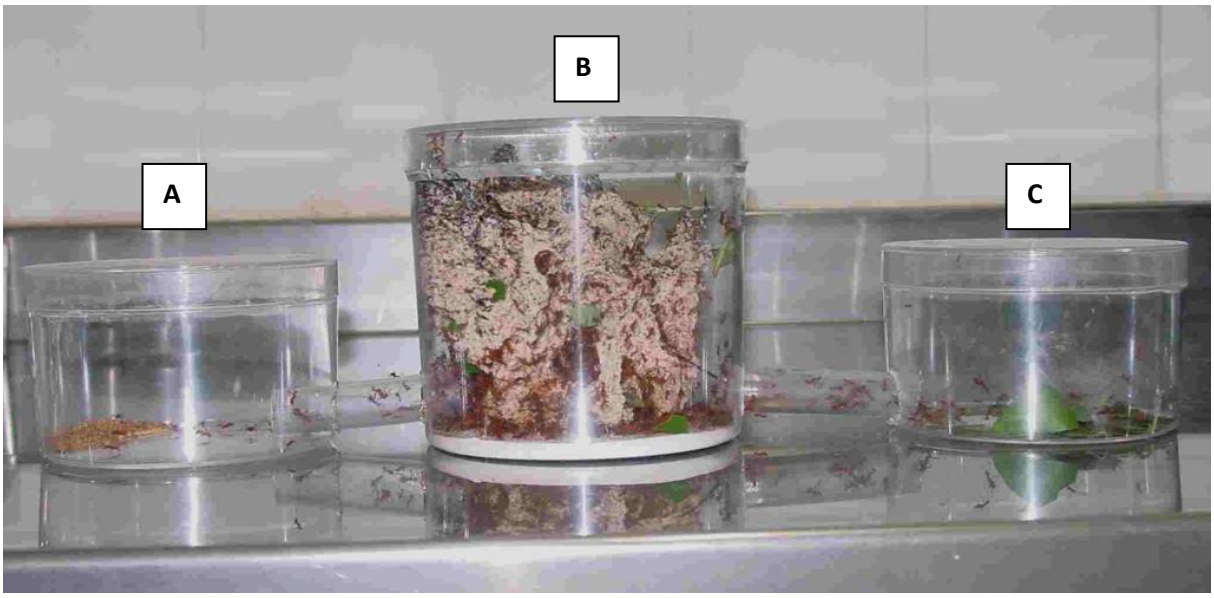


Figura 4: Vista geral de uma colônia incipiente de *Atta sexdens rubropilosa* mantida em laboratório. **(A** - câmara de lixo, **B** - câmara de fungo e **C** – câmara de forrageamento).

3.2.2. Preparação das iscas

Os ingredientes ativos foram adicionados em uma mistura de polpa cítrica em pó e óleo de soja na proporção 9:1, contendo 0.005% de aglomerante Carboxi Metil Celulose (CMC). Para o diafentiurom, as concentrações finais utilizadas foram 5.000 µg/g (0.5%), 10.000 µg/g (1%) e 50.000 µg/g (5%) e para o tolfenpyrad foram 500 µg/g (0.05%), 1.000

µg/g (0.1%) e 5.000 µg/g (0.5%). A isca controle foi preparada apenas com polpa cítrica, óleo de soja e CMC, sem adição de ingrediente ativo. As misturas foram processadas em uma peletizadora comercial de pequeno porte, obtendo-se pellets de 0.5 cm de diâmetro e 1 cm de comprimento. Após a peletização as iscas foram colocadas em peneiras e resfriadas com o auxílio de um ventilador. Para melhor conservação, foram embaladas em sacos plásticos e armazenadas em local seco até a realização dos experimentos (BUENO et al., 2005a).

3.2.3. Avaliação das iscas

As colônias incipientes de *A. sexdens rubropilosa* foram distribuídas em quatro colônias para cada tratamento. Além dos tratamentos com as três concentrações de cada ingrediente ativo, utilizou-se um grupo controle que recebeu somente isca sem ingrediente ativo e um controle positivo com a isca comercial Mirex – S Max® (sulfluramida 0.3%) para comparação da eficácia das iscas.

O lixo e os restos de folhas foram retirados das câmaras de lixo e de forrageamento e as colônias ficaram sem receber o substrato vegetal por um dia. Após esse período, cada colônia recebeu 3 g de isca do respectivo tratamento que ficou disponível para coleta das operárias por 24 horas (Figura 5).



Figura 5: Colônia de *Atta sexdens rubropilosa* submetida ao tratamento com iscas contendo ingrediente ativo.

Após 24 horas do oferecimento das iscas, a sobra do material foi retirada e pesada para estimar o carregamento. Além disso, a incorporação da isca no jardim de fungo e a ocorrência de devolução de iscas também foram avaliadas.

As colônias voltaram a receber o substrato vegetal e durante três semanas subsequentes foram realizadas avaliações diárias, baseadas nas observações de intoxicação das formigas, corte de folhas, mortalidade de formigas, mudança de panela, presença de fungo filamentoso, presença de pedaços de fungo no lixo, desorganização do fungo simbionte, mortalidade da rainha e condições da colônia (FORTI et al., 1993). Além disso, todo material presente nas câmaras de lixo e de forrageamento foi retirado semanalmente.

Para os itens avaliados foram utilizadas as seguintes escalas de quantificação:

♦ Carregamento da isca pelas formigas: **0** - sem carregamento; **1** - carregamento de 25%; **2** - carregamento de 50%; **3** - carregamento de 75%; **4** - carregamento de 100%.

♦ Incorporação da isca no jardim de fungo: **0** - sem incorporação; **1** - incorporação de 25%; **2** - incorporação de 50%; **3** - incorporação de 75%; **4** - incorporação de 100%.

♦ Devolução da isca: **0** - sem devolução; **1** - devolução de 25%; **2** - devolução de 50%; **3** - devolução de 75%; **4** - devolução de 100%.

♦ Intoxicação de formigas: **0** - sem sintomas de intoxicação; **1** - 25% das formigas intoxicadas; **2** - 50% das formigas intoxicadas; **3** - 75% das formigas intoxicadas e; **4** - 100% das formigas intoxicadas.

♦ Corte de folhas: **0** - sem corte de folhas; **1** - corte de 25% das folhas; **2** - corte de 50% das folhas; **3** - corte de 75% das folhas; **4** - corte de 100% das folhas.

♦ Mortalidade de formigas: **0** - sem mortalidade; **1** - 25% das formigas mortas; **2** - 50% das formigas mortas; **3** - 75% das formigas mortas e; **4** - 100% das formigas mortas.

♦ Colônia com mudança de panela de fungo: **0** - sem mudança e; **1** - com mudança.

♦ Corte de fungo: **0** - sem corte de fungo e; **1** – com corte de fungo.

♦ Colônia com redução no jardim de fungo: **0** - sem redução; **1** - com redução.

♦ Colônia com presença de fungo filamentoso: **0** - sem ocorrência de contaminação e; **1** - com ocorrência de contaminação.

♦ Rainha morta: **0** - rainha viva; **1** - rainha morta.

♦ Condições da colônia: **0** - colônia morta; **1** - regressão de 75% da colônia; **2** - regressão de 50% da colônia; **3** - regressão de 25% da colônia e; **4** - colônia em perfeitas condições.

A análise gráfica de cada item observado foi realizada através dos valores acumulados das 4 repetições (colônias).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Toxicidade para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Os resultados obtidos para cada bioensaio estão apresentados através das análises gráficas das curvas de sobrevivência e das tabelas que resumem as porcentagens acumuladas de mortalidade diária, o tempo de sobrevivência mediana e a interpretação do teste "log rank".

Os controles acetona e acetona + óleo não apresentaram diferença significativa em relação ao controle dieta pura, indicando que o solvente utilizado e o óleo de soja não influenciaram na mortalidade das operárias de *A. sexdens rubropilosa* (Tabelas 3, 4, 5 e 6).

4.1.1. Diafentiurom

O diafentiurom dissolvido em acetona provocou diminuição na sobrevivência das operárias de *A. sexdens rubropilosa,* com redução mais acentuada para a concentração 100 µg/mL (Figura 6). A análise estatística revelou que as concentrações 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL apresentaram valores significativos quando comparados com o controle acetona. A mortalidade total das operárias ocorreu no 20º dia para a concentração 50 µg/mL, no 16º dia para a concentração 100 µg/mL, no 17º dia para a concentração 500 µg/mL e no 21º dia para a concentração 1000 µg/mL. Não ocorreu mortalidade total das operárias até o término do experimento para as concentrações 1 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL (Tabela 3).

As formigas mantidas com dieta artificial contendo diafentiurom dissolvido em acetona apresentaram sintomas de intoxicação, principalmente dificuldade de locomoção e imobilidade (lentidão), a partir do 4º dia de experimento para as concentrações 500 µg/mL e 1000 µg/mL, a partir do 6º dia para a concentração 100 µg/mL e a partir do 10º dia para as concentrações 10 µg/mL e 50 µg/mL. As formigas tratadas com diafentiurom nas concentrações 1 µg/mL e 5 µg/mL não apresentaram sintomas de intoxicação. Diante dos primeiros sintomas de intoxicação observados no 4º dia de experimento, o diafentiurom dissolvido em acetona na concentração 500 µg/mL foi selecionado para a realização da análise morfológica.

O diafentiurom dissolvido em mistura de acetona + óleo de soja também provocou diminuição na sobrevivência das operárias de *A. sexdens rubropilosa*, com redução mais acentuada para as concentrações 500 µg/mL e 1000 µg/mL (Figura 7). A análise estatística

revelou que as concentrações 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL apresentaram valores significativos quando comparados com o controle acetona + óleo. A mortalidade total das operárias ocorreu no 25º dia para a concentração 10 µg/mL, no 19º dia para a concentração 50 µg/mL, no 14º dia para a concentração 100 µg/mL, no 12º dia para a concentração 500 µg/mL e no 13º dia para a concentração 1000 µg/mL. Não ocorreu mortalidade total das operárias até o término do experimento para as concentrações 1 µg/mL e 5 µg/mL (Tabela 4).

As formigas mantidas com dieta artificial contendo diafentiurom dissolvido em acetona + óleo também apresentaram sintomas de intoxicação, principalmente dificuldade de locomoção e imobilidade (lentidão), a partir do 2º dia de experimento para a concentração 1000 µg/mL, a partir do 4º dia para a concentração 500 µg/mL, a partir do 5º dia para a concentração 100 µg/mL, a partir do 9º dia para as concentrações 10 µg/mL e 50 µg/mL e a partir do 15º dia para as concentrações 1 µg/mL e 5 µg/mL. Diante dos sintomas de intoxicação observados no 4º dia de experimento, o diafentiurom dissolvido em acetona + óleo na concentração 500 µg/mL foi selecionado para a realização da análise morfológica.

A toxicidade do diafentiurom nos testes de incorporação em dieta artificial aumentou com a presença do óleo de soja. A mediana do tempo de sobrevivência das operárias foi reduzida de 17 dias para 9 dias na concentração 10 µg/mL, de 14 dias para 10 dias na concentração 50 µg/mL, de 10 dias para 9 dias na concentração 100 µg/mL, de 12 dias para 7 dias na concentração 500 µg/mL e de 11 dias para 6 dias na concentração 1000 µg/mL O tempo de mortalidade total das formigas também foi reduzido de 20 dias para 19 dias na concentração 50 µg/mL, de 16 dias para 14 dias na concentração 100 µg/mL, de 17 dias para 12 dias na concentração 500 µg/mL e de 21 dias para 13 dias na concentração 1000 µg/mL.

A partir dos resultados obtidos nos bioensaios toxicológicos foi possível selecionar as concentrações de diafentiurom para o desenvolvimento de iscas. Baseando-se na metodologia de Bueno (2005), as concentrações consideradas tóxicas (50 µg/mL, 100 µg/mL e 500 µg/mL) foram aumentadas em 100 vezes pelo fato das iscas serem oferecidas uma única vez às colônias. A concentração 1000 µg/mL foi descartada por apresentar toxicidade muito semelhante à concentração 500 µg/mL, sendo apenas selecionadas as menores concentrações que apresentaram toxicidade.

Tabela 3. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com diafentiurom dissolvido em acetona

Tratamentos	% acumulada de mortalidade por dia																									Md *
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Controle dieta pura	0	2	2	2	2	2	2	2	4	4	4	6	6	8	8	10	10	12	14	16	18	18	18	24	32	>25 *a*
Controle acetona	0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	4	10	10	10	10	10	12	14	14	16	16	18	18	24	24	>25 *a*
Diafentiurom 1µg/mL	0	2	4	4	4	4	4	4	6	6	6	6	6	6	8	12	12	12	18	20	22	22	28	36	36	>25 *a*
Diafentiurom 5µg/mL	0	2	2	2	4	6	6	6	8	12	18	28	34	42	52	66	68	76	80	88	88	88	92	96	96	15 *b*
Diafentiurom 10µg/mL	0	2	2	2	2	4	4	6	6	8	16	22	26	34	38	46	56	64	72	78	82	82	90	98	98	17 *b*
Diafentiurom 50µg/mL	0	0	0	0	0	0	6	8	10	10	20	26	40	56	70	78	82	94	98	100	---	---	---	---	---	14 *b*
Diafentiurom 100µg/mL	0	2	2	2	2	6	12	20	44	52	58	78	90	98	98	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	10 *b*
Diafentiurom 500µg/mL	0	0	0	0	0	2	8	12	20	36	44	54	72	84	98	98	100	---	---	---	---	---	---	---	---	12 *b*
Diafentiurom 1000µg/mL	0	0	2	2	2	2	6	6	14	34	50	58	72	78	84	88	92	92	94	98	100	---	---	---	---	11 *b*

***** Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($P < 0.05$).

Tabela 4. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com diafentiurom dissolvido em acetona + óleo

Tratamentos	% acumulada de mortalidade por dia																									Md *
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Controle dieta pura	0	0	0	2	4	6	6	8	8	10	10	12	12	18	18	18	24	24	24	24	28	28	30	36	44	>25 *a*
Controle acetona + óleo	0	4	4	4	4	4	4	4	6	8	8	8	8	12	14	16	16	16	18	18	18	22	24	28	30	>25 *a*
Diafentiurom 1µg/mL	2	10	12	14	14	14	14	16	22	22	22	22	34	34	34	34	34	34	34	40	40	40	46	48	50	25 *a*
Diafentiurom 5µg/mL	0	12	16	18	20	22	22	22	26	28	32	36	44	46	50	50	56	56	62	68	68	70	70	74	78	16 *b*
Diafentiurom 10µg/mL	6	16	18	22	22	38	44	48	62	68	76	84	90	94	94	98	98	98	98	98	98	98	98	98	100	9 *b*
Diafentiurom 50µg/mL	2	4	4	8	16	22	26	30	34	56	74	86	94	96	96	96	96	96	100	---	---	---	---	---	---	10 *b*
Diafentiurom 100µg/mL	2	6	6	10	14	20	24	36	58	76	82	90	96	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	9 *b*
Diafentiurom 500µg/mL	2	6	14	22	30	48	62	72	88	92	94	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	7 *b*
Diafentiurom 1000µg/mL	0	4	6	10	42	66	70	74	80	90	94	98	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	6 *b*

***** Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($P < 0.05$)

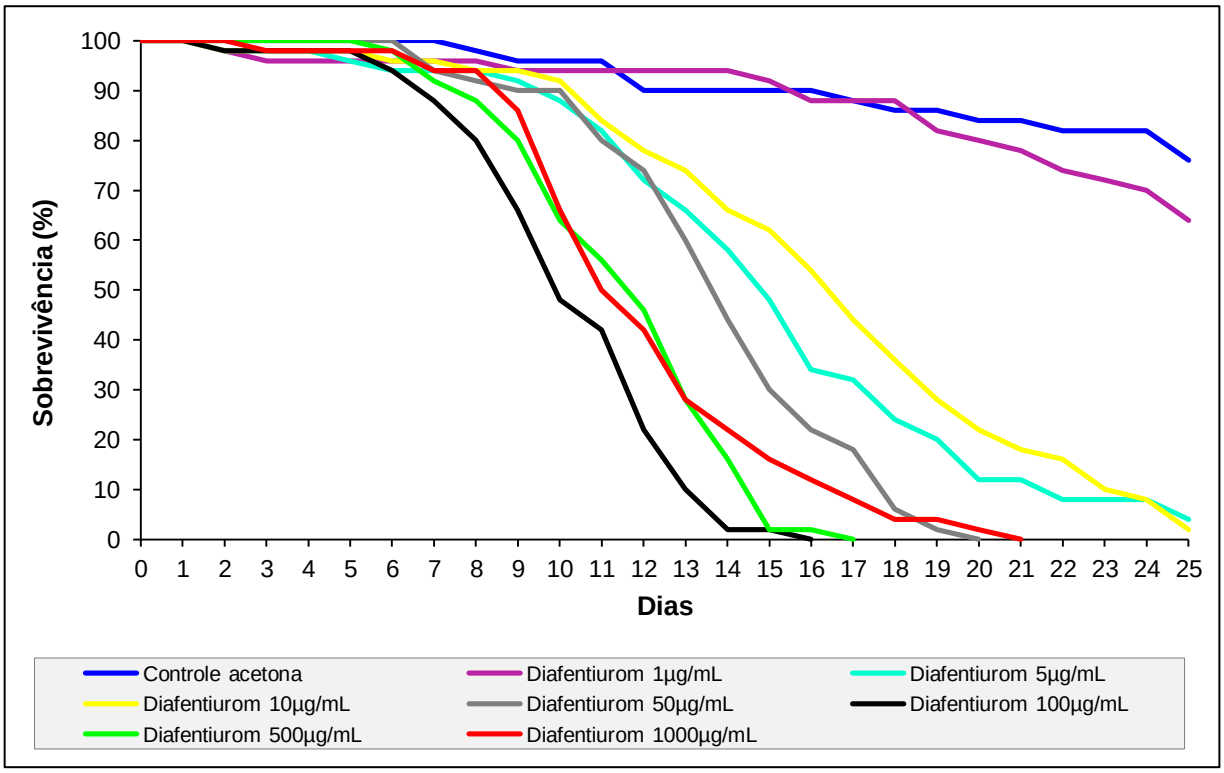


Figura 6: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com diafentiurom dissolvido em acetona.

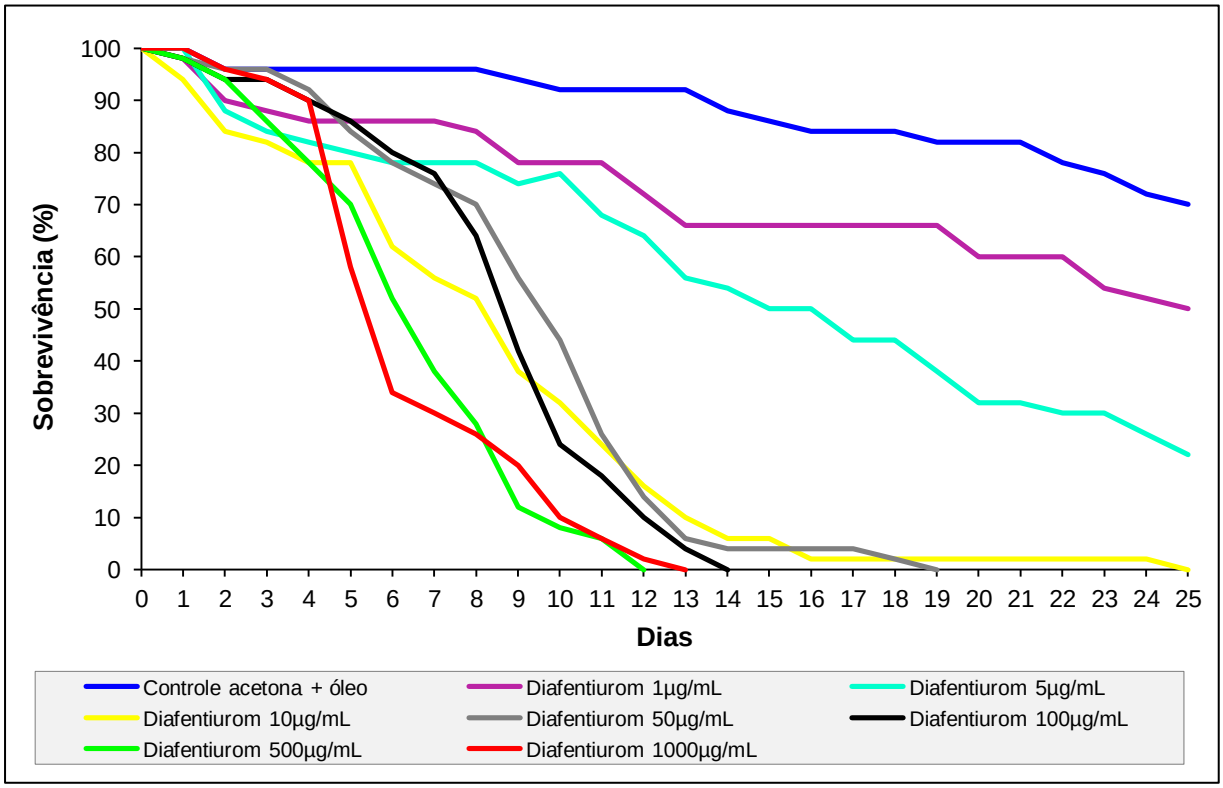


Figura 7: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com diafentiurom dissolvido em acetona + óleo.

4.1.2. Tolfenpyrad

O tolfenpyrad dissolvido em acetona provocou diminuição na sobrevivência das operárias de *A. sexdens rubropilosa,* com redução mais acentuada para as concentrações 50 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL (Figura 8). A análise estatística revelou que todas as concentrações testadas apresentaram valores significativos quando comparados com o controle acetona. A mortalidade total das operárias ocorreu no 24º dia para a concentração 10 µg/mL, no 14º dia para a concentração 50 µg/mL, no 10º dia para a concentração 100 µg/mL, no 7º dia para a concentração 500 µg/mL e no 8º dia para a concentração 1000 µg/mL. Não ocorreu mortalidade total das operárias até o término do experimento para as concentrações 1 µg/mL e 5 µg/mL (Tabela 5).

As formigas mantidas com dieta artificial contendo tolfenpyrad dissolvido em acetona apresentaram sintomas de intoxicação, principalmente tremores, a partir do 3º dia de experimento para as concentrações 100 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL, a partir do 4º dia para a concentração 50 µg/mL, a partir do 5º dia para a concentração 10 µg/mL, a partir do 7º dia para a concentração 5 µg/mL e a partir do 10º dia para a concentração 1 µg/mL. Diante dos sintomas de intoxicação observados no 4º dia, o tolfenpyrad dissolvido em acetona na concentração 50 µg/mL foi selecionado para a realização da análise morfológica.

O tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo também provocou diminuição na sobrevivência das operárias de *A. sexdens rubropilosa*, com redução mais acentuada para as concentrações 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL (Figura 9). A análise estatística revelou que todas as concentrações testadas apresentaram valores significativos quando comparados com o controle acetona + óleo. A mortalidade total das operárias ocorreu no 21º dia para a concentração 1 µg/mL, no 10º dia para a concentração 5 µg/mL, no 7º dia para a concentração 10 µg/mL, no 6º dia para a concentração 50 µg/mL, no 3º dia para as concentrações 100 µg/mL e 500 µg/mL e no 4º dia para a concentração 1000 µg/mL (Tabela 6).

As formigas mantidas com dieta artificial contendo tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo também apresentaram sintomas de intoxicação, principalmente tremores, a partir do 1º dia para as concentrações 50 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL, a partir do 2º dia para a concentração 10 µg/mL, a partir do 4º dia para a concentração 5 µg/mL e a partir do 7º dia para a concentração 1 µg/mL. Diante de tais sintomas, o tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo na concentração 5 µg/mL foi selecionado para a análise morfológica.

A toxicidade do tolfenpyrad aumentou com a presença do óleo de soja. A mediana do tempo de sobrevivência das operárias foi reduzido de 24 dias para 9.5 dias na concentração 1 μg/mL, de 10 dias para 4 dias na concentração 5 μg/mL, de 7.5 dias para 3 dias na concentração 10 μg/mL, de 4 dias para 1 dia na concentração 50 μg/mL, de 3 dias para 1 dia na concentração 100 μg/mL, de 2 dias para 1 dia na concentração 500 μg/mL e de 5 dias para 1 dia na concentração 1000 μg/mL. O tempo de mortalidade total das formigas também foi reduzido de 24 dias para 7 dias na concentração 10 μg/mL, de 14 dias para 6 dias na concentração 50 μg/mL, de 10 dias para 3 dias na concentração 100 μg/mL, de 7 dias para 3 dias na concentração 500 μg/mL e de 8 dias para 4 dias na concentração 1000 μg/mL.

A partir dos resultados obtidos nos bioensaios toxicológicos foi possível selecionar as concentrações de tolfenpyrad para o desenvolvimento de iscas. Baseando-se na metodologia de Bueno (2005), as concentrações consideradas tóxicas (5 μg/mL, 10 μg/mL e 50 μg/mL) foram aumentadas em 100 vezes pelo fato das iscas serem oferecidas somente uma única vez às colônias. As concentrações 100 μg/mL, 500 μg/mL e 1000 μg/mL foram descartadas por apresentar toxicidade muito semelhante à concentração 50 μg/mL. Assim, foram selecionadas as menores concentrações que apresentaram toxicidade.

Uma das características fundamentais para que uma isca seja eficiente no controle de formigas é a presença de um ingrediente ativo de ação lenta, possibilitando que as operárias vivam o suficiente para distribuí-lo por toda a colônia. O conceito de toxicidade lenta foi utilizado primeiramente para seleção de ingredientes ativos para o controle de formigas lava-pés (STRINGER et al., 1964; WILLIAMS, 1983; VANDER MEER et al., 1985) e, posteriormente, foi adaptado por Nagamoto (1998, 2003) para formigas-cortadeiras. Envolve a seleção de ingredientes ativos que causam baixa mortalidade 24 horas após a aplicação (menor que 15%) e alta mortalidade ao término do experimento (acima de 90%).

Os bioensaios toxicológicos com operárias de *A. sexdens rubropilosa* isoladas do formigueiro apresentaram resultados promissores para os inibidores da respiração celular diafentiurom e tolfenpyrad, ou seja, baixa mortalidade nas primeiras 24 horas após a aplicação e alta mortalidade ao término do experimento, principalmente na presença do óleo de soja. Utilizando-se de metodologia semelhante, Takahashi-del-Bianco (2002) comprovou a toxicidade da sulfluramida na concentração 3 μg/mL para operárias de *A. sexdens rubropilosa* isoladas do formigueiro. Posteriormente, a rotenona (CECATTO, 2010) e a hidrametilnona (BUENO et al., 2013; DECIO et al., 2013) também foram testadas e ambos os ingredientes ativos apresentaram resultados satisfatórios. A rotenona dissolvida em acetona apresentou

toxicidade às operárias de *A. sexdens rubropilosa* na concentração 500 μg/mL. Contudo, quando dissolvida em mistura de acetona e óleo de soja, todas as concentrações testadas apresentaram resultados satisfatórios (10 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL e 500 μg/mL). A hidrametilnona dissolvida em acetona provocou diminuição na sobrevivência das operárias de *A. sexdens rubropilosa*, com redução mais acentuada para a concentração 1000μg/mL, sendo que na presença do óleo de soja também apresentou resultados satisfatórios na concentração 200 μg/mL.

A descoberta de novos ingredientes ativos para serem utilizados em iscas tóxicas no controle de formigas-cortadeiras não é um processo fácil e deve ser conduzido com o maior rigor científico. De acordo com FORTI et al. (1993), no período entre 1989 a 1993, 90% das substâncias testadas para o controle de espécies do gênero *Atta* apresentaram 0% de eficiência e outros 10% apresentaram eficiência menor que 40%, ou seja, insatisfatória. Somente nos últimos três anos, o Centro de Estudos de Insetos Sociais do Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista – UNESP testou mais de 40 ingredientes ativos para empresas particulares por meio de bioensaios toxicológicos com operárias de *A. sexdens rubropilosa* isoladas do formigueiro e nenhum deles apresentou toxicidade (BUENO, O.C., informação pessoal).

A análise da toxicidade para operárias isoladas do formigueiro é apenas uma primeira etapa para a avaliação da eficácia de um ingrediente ativo e não é fator determinante para avaliar se a molécula é eficiente ou não para o controle de colônias de formigas-cortadeiras. Esse tipo de bioensaio onde as formigas são mantidas exclusivamente com a dieta alimentar contendo ingrediente ativo, sem oportunidade de escolha de alimento, permite o controle de muitas variáveis para analisar somente a toxicidade. Entretanto, muitas dúvidas surgem em relação ao efeito repelente que o ingrediente ativo possa estar causando nas operárias, impedindo que elas se alimentem. Neste caso, as formigas morreriam por falta de nutrientes e não pela ação tóxica do ingrediente ativo. Quando um ingrediente ativo apresenta resultados satisfatórios em testes com operárias isoladas do formigueiro é necessário que os testes em colônias incipientes sejam realizados para comprovação da eficácia. Por este motivo, o diafentiurom e o tolfenpyrad foram incorporados em iscas para avaliação em colônias incipientes de *A. sexdens rubropilosa*.

Tabela 5. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com tolfenpyrad dissolvido em acetona

Tratamentos	% acumulada de mortalidade por dia																									Md *
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Controle dieta pura	2	4	6	6	8	10	12	14	14	14	14	14	14	14	16	18	20	20	20	20	22	26	28	30	32	>25 *a*
Controle acetona	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	6	6	6	8	12	14	14	16	20	22	24	30	32	>25 *a*
Tolfenpyrad 1µg/mL	0	2	2	2	4	4	4	4	10	12	14	14	14	18	20	22	24	24	28	32	34	36	46	54	56	>24 *b*
Tolfenpyrad 5µg/mL	0	2	4	4	8	20	30	38	48	54	60	60	68	70	74	80	82	84	84	92	94	98	98	98	98	10 *b*
Tolfenpyrad 10µg/mL	0	0	4	8	22	38	50	66	84	90	92	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	98	100	100	7.5 *b*
Tolfenpyrad 50µg/mL	2	10	34	54	68	80	90	92	96	98	98	98	98	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	4 *b*
Tolfenpyrad 100µg/mL	6	30	60	74	82	94	96	98	98	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	3 *b*
Tolfenpyrad 500µg/mL	30	58	78	90	94	98	100	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2 *b*
Tolfenpyrad 1000µg/mL	4	10	32	42	66	78	94	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	5 *b*

***** Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($P < 0.05$).

Tabela 6. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo

Tratamentos	% acumulada de mortalidade por dia																									Md *
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Controle dieta pura	0	2	2	4	4	6	10	14	18	24	24	26	28	30	34	36	40	44	46	50	52	54	56	58	62	21 *a*
Controle acetona	0	0	0	4	4	6	10	14	16	18	22	26	30	34	36	40	42	48	52	54	56	58	60	62	64	19 *a*
Tolfenpyrad 1µg/mL	0	0	8	18	24	32	36	40	50	60	62	66	68	74	80	78	92	96	96	98	100	---	---	---	---	9.5 *b*
Tolfenpyrad 5µg/mL	4	16	22	52	68	76	84	98	98	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	4 *b*
Tolfenpyrad 10µg/mL	4	18	52	74	84	96	100	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	3 *b*
Tolfenpyrad 50µg/mL	80	94	94	96	96	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1 *b*
Tolfenpyrad 100µg/mL	92	96	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1 *b*
Tolfenpyrad 500µg/mL	86	98	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1 *b*
Tolfenpyrad 1000µg/mL	82	96	96	100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1 *b*

***** Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste "log rank" ($P < 0.05$).

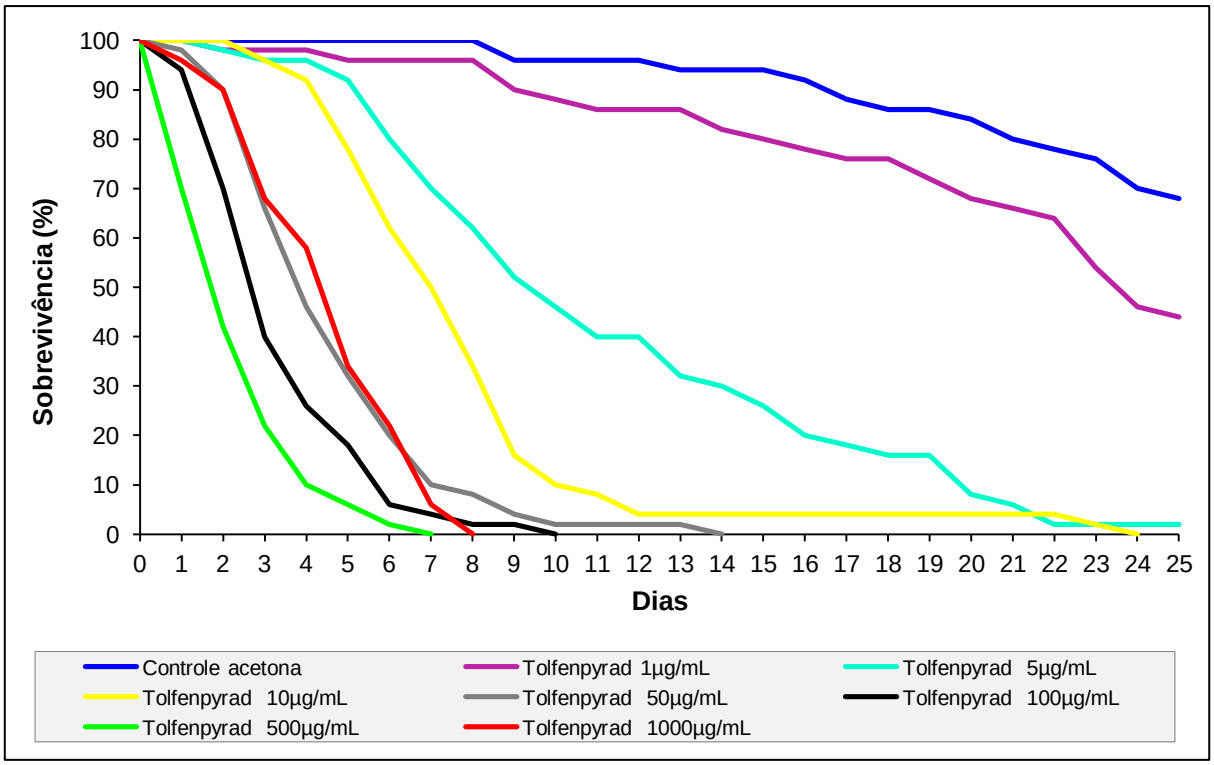


Figura 8: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com tolfenpyrad dissolvido em acetona.

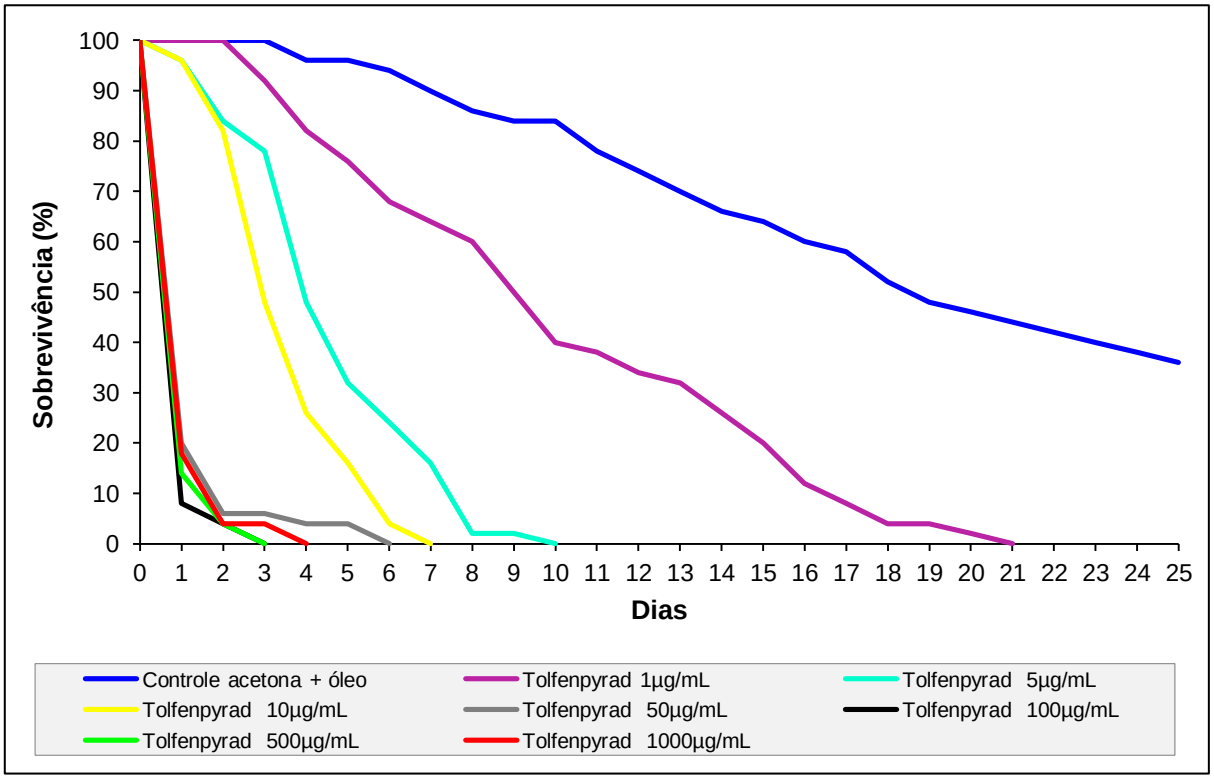


Figura 9: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo.

4.2. Análise morfológica – Microscopia de luz

4.2.1. Glândulas pós-faríngeas

As glândulas pós-faringeas de *A. sexdens rubropilosa* são constituídas de dois cachos de lobos ramificados que terminam em uma estrutura em forma de 'saco', a qual se estreita formando um canal levemente quitinizado. Os lobos são formados por epitélio simples com células cilíndricas e núcleo volumoso. Além disso, o epitélio glandular apresenta cutícula em contato com o lúmen (Figuras 10A-B e 11A-B).

Nos grupos controle acetona e acetona + óleo, as glândulas pós-faringeas de *A. sexdens rubropilosa* não apresentam alterações morfológicas (Figuras 10A-B e 11A-B). O epitélio glandular apresenta-se lobulado (Figuras 10A e 11A) e os núcleos celulares encontram-se intactos, com a presença de nucléolos típicos (Figuras 10A-B e 11A-B). A cutícula (Figuras 10B e 11A) e o citoplasma (Figuras 10A-B e 11A-B) também se apresentam regulares.

No tratamento com diafentiurom dissolvido em acetona na concentração 500 μg/mL as células apresentam morfologia distinta ao controle, com núcleos com cromatina marginalizada (Figura 10C-E), núcleos picnóticos (Figura 10C-D) e vacuolizações citoplasmáticas (Figura 10D-E). Além disso, o lúmen encontra-se reduzido (Figura 10C-D).

No tratamento com diafentiurom dissolvido em acetona + óleo na concentração 500 μg/mL é possível observar acúmulo de gotas lipídicas no citoplasma das células (Figura 10H). Há também a presença de núcleos (n) com cromatina marginalizada (Figura 10F), núcleos picnóticos (Figura 10F-G), além de regiões citoplasmáticas contendo vacuolização (Figura 10G-H).

No tratamento com tolfenpyrad dissolvido em acetona na concentração 50 μg/mL há a presença de núcleos picnóticos (Figura 11E) e vacuolização citoplasmática (Figura 11C-E).

No tratamento com tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo na concentração 5 μg/mL podem ser observados núcleos picnóticos (Figura 11F-G), núcleos com cromatina marginalizada (Figura 11F) e vacúolos citoplasmáticos nas células glandulares (Figura 11G-H).

4.2.2. Ventrículo

O ventrículo de *A. sexdens rubropilosa* apresenta basicamente dois tipos celulares: as células digestivas e as células regenerativas. As células digestivas são longas e aparecem em

grande número formando o epitélio ventricular, o qual possui uma única camada de células colunares funcionais ou células principais. Entre as células digestivas, as *goblet cells* possuem função secretora (CAETANO et al., 1994) e apresentam secreção no seu interior, aqui definidas como vesículas de secreção. Essas células estão unidas por seu ápice, formando uma cavidade que se abre para o lúmen do ventrículo. As células regenerativas aparecem isoladas ou em ninhos de células diminutas próximas a base do epitélio ventricular (Figuras 12A-B e 13A-B). O epitélio ventricular está sobre a membrana basal e encontra-se recoberto por musculatura longitudinal (Figuras 12A-B e 13A).

Nos grupos controle acetona e acetona + óleo, o epitélio ventricular de *A. sexdens rubropilosa* não apresenta alterações morfológicas (Figuras 12A-B e 13A-B). Ocorre grande quantidade de *goblet cells* entre as células digestivas distribuídas por todo o epitélio e os núcleos dessas células encontram-se intactos. Além disso, há ninhos de células regenerativas junto às células digestivas, indicando intensa renovação do epitélio ventricular. Os núcleos das células regenerativas também se apresentam intactos (Figuras 12A-B e 13A-B).

No tratamento com diafentiurom dissolvido em acetona na concentração 500 µg/mL há no número de *goblet cells* e vesículas de secreção entre as células digestivas (Figura 12C-E) em comparação aos grupos controle. Adicionalmente, observa-se vacuolização citoplasmática em células digestivas (Figura 12C e E), além de picnose nuclear (Figura 12C-E) e núcleos com cromatina marginalizada (Figura 12E). Também há significante redução no número de células regenerativas (Figura 12C-E).

No tratamento com diafentiurom dissolvido em acetona + óleo na concentração 500 µg/mL também ocorre diminuição do número de vesículas de secreção (Figura 12F e H) e as *goblet cells* encontram-se praticamente ausentes (Figura 12F-H). Nota-se grande quantidade de vacuolização citoplasmática das células digestivas (Figura 12F e H), picnose nuclear (Figura 12F-H) e núcleos com cromatina marginalizada (Figura 12F e G). Além disso, também há redução no número de células regenerativas (Figura 12F-H).

No tratamento com tolfenpyrad dissolvido em acetona na concentração 50 µg/mL há diminuição no número de células regenerativas e digestivas (Figura 13D-E), bem como no número de vesículas de secreção (Figura 13C-E) e *goblet cells* (Figura 13E). Adicionalmente, observa-se vacuolização citoplasmática das células digestivas (Figura 13C-E), além de picnose nuclear (Figura 13C-D).

No tratamento com tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo na concentração 5 µg/mL também há redução no número de células regenerativas e digestivas (Figura 13F-H), bem como no número de vesículas de secreção (Figura 13F e H) e *goblet cells* (Figura 13F). Nota-

se pouca vacuolização citoplasmática das células digestivas (Figura 13F e H) e poucos núcleos picnóticos (Figura 13F-H), além da presença de óleo de soja em contato com as *goblet cells* (Figura 13G).

4.2.3. Túbulos de Malpighi

Os túbulos de Malpighi de *A. sexdens rubropilosa* apresentam-se tubulares como nas demais espécies de formigas e são constituídos por tecido epitelial simples (Figuras 14A-B e 15A-B) envolvendo o lúmen (Figura 14B). Em corte transversal aparecem como anéis, com as células altas e o lúmen pequeno (Figuras 14B e 15B).

Nos grupos controle acetona e acetona + óleo, os túbulos de Malpighi não apresentam alterações morfológicas (Figuras 14A-B e 15A-B). As células epiteliais apresentam núcleos e nucléolos intactos, bem como grande quantidade de grânulos mineralizados (Figuras 14A-B e 15A-B).

No tratamento com diafentiurom dissolvido em acetona na concentração 500 µg/mL as células epiteliais dos túbulos de Malpighi apresentam picnose nuclear (Figura 14D-E) e núcleos com cromatina marginalizada (Figura 14D), além de inúmeras vacuolizações citoplasmáticas (Figura 14C-E). Nota-se ainda, aumento na quantidade e no tamanho dos grânulos mineralizados (Figura 14C e E).

No tratamento com diafentiurom dissolvido em acetona + óleo na concentração 500 µg/mL é possível notar a presença de muitos núcleos intactos (n) e de alguns núcleos picnóticos (Figura 14G), bem como de alguns núcleos com cromatina marginalizada (Figura 14F). Porém, não ocorrem vacuolizações citoplasmáticas. Além disso, há um aumento considerável na quantidade e no tamanho dos grânulos mineralizados (Figura 14F-H).

No tratamento com tolfenpyrad dissolvido em acetona na concentração 50 µg/mL as células epiteliais apresentam núcleos picnóticos (Figura 15C) e vacuolizações citoplasmáticas (Figura 15C-E). Nota-se ainda, aumento na quantidade e no tamanho dos grânulos mineralizados (Figura 15C-E).

No tratamento com tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo na concentração 5 µg/mL observa-se muitos núcleos intactos e poucos núcleos picnóticos (Figura 15F). Há também muitas vacuolizações citoplasmáticas e poucos grânulos mineralizados (Figura 15F-H).

As análises morfológicas das glândulas pós-faríngeas, do ventrículo e dos túbulos de Malpighi das operárias tratadas com diafentiurom na concentração 500 µg/mL (dissolvido em acetona e em uma mistura de acetona + óleo), tolfenpyrad dissolvido em acetona na concentração 50 µg/mL e tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo na concentração 50 µg/mL revelaram alterações morfológicas em todos os órgãos estudados. Nas glândulas pós-faríngeas foi possível observar características indicativas de morte celular, evidenciada pela presença de picnose nuclear (BOWEN; BOWEN, 1990; BOWEN et al., 1998), núcleos com marginalização cromatínica (BOWEN et al., 1998) e regiões citoplasmáticas vacuolizadas (SILVA-ZACARIN, 2007) para os dois ingredientes ativos avaliados. No ventrículo ocorreu diminuição no número de células regenerativas e digestivas, indicando redução na renovação do epitélio ventricular, além de picnose nuclear, núcleos com marginalização cromatínica e regiões citoplasmáticas vacuolizadas em ambos os ingredientes ativos. E, nos túbulos de Malpighi também foi possível observar picnose nuclear, núcleos com marginalização cromatínica e regiões citoplasmáticas vacuolizadas para os dois ingredientes ativos.

As alterações morfológicas ocorreram nos três órgãos avaliados, independente do ingrediente ativo estar dissolvido em óleo de soja ou não. Portanto, a presença do óleo de soja não indicou uma via alternativa de ingestão para o diafentiurom e para o tolfenpyrad, como relatado para a hidrametilnona. Segundo Decio et al., (2013), o fato da hidrametilnona dissolvida em acetona + óleo promover drásticas alterações morfológicas somente nas glândulas pós-faríngeas de operárias de *A. sexdens rubropilosa*, poderia estar relacionado à ação do óleo no transporte e acúmulo no interior desses órgãos. Essa hipótese baseia-se no fato de que a glândula pós-faríngea estaria envolvida no metabolismo de lipídios (BUENO, 2005b; SCHOETERS; BILLEN, 1997). Dessa forma, a presença do óleo poderia ter promovido o transporte da maior parte do alimento para o lúmen das glândulas pós-faríngeas, diminuindo a quantidade de hidrametilnona a ser absorvida pelo intestino e, posteriormente, a ser excretada pelos túbulos de Malpighi. Em testes preliminares utilizando a sulfluramida dissolvida em mistura de acetona e óleo de soja na concentração 200 µg/mL, Sumida (2007) encontrou resultados semelhantes aos de Decio et al. (2013), ou seja, as operárias de *A. sexdens rubropilosa* tratadas com sulfluramida também apresentaram alterações morfológicas apenas nas glândulas pós-faríngeas.

Os ingredientes ativos solúveis em água aparentemente apresentam outra via de ação. Operárias de *A. sexdens rubropilosa* isoladas dos formigueiros e tratadas com ácido bórico apresentaram alterações morfológicas progressivas nas células digestivas do epitélio ventricular, provavelmente porque esse ingrediente ativo forma complexos com grupos

funcionais orgânicos nas células digestivas, as quais são metabolicamente ativas na secreção enzimática, comprometendo a síntese e/ou liberação de secreção. Os túbulos de Malpighi apresentaram alterações morfológicas evidentes somente na região proximal, indicando que a região distal é capaz de excretar o ingrediente ativo sem sofrer a interferência do mesmo em suas células. Como o ácido bórico é solúvel em água, a quantidade ingerida pelas formigas foi facilmente absorvida pelas células do ventrículo e transportada para a hemolinfa, diluindo-a neste fluido. A porção distal dos túbulos de Malpighi, ao filtrar o ácido bórico diluído na água constituinte da hemolinfa, excreta-o para o seu lúmen sem comprometer as células dessa região tubular. À medida que as células excretoras transferem o ácido bórico da hemolinfa para o lúmen dos túbulos, a concentração desse ingrediente ativo aumenta. Dessa forma, a quantidade de ácido bórico que pode estar sendo reabsorvida na região tubular proximal compromete as células desse local. Finalmente, a vacuolização citoplasmática também pode ser observada nas glândulas pós-faríngeas. Esse órgão absorve compostos da hemolinfa como precursor do produto produzido pela mesma e, provavelmente, foi a via de entrada do ácido bórico nas células secretoras glandulares (SUMIDA et al., 2010).

Apesar do óleo de soja não ter indicado uma via alternativa de ingestão para o diafentiurom e para o tolfenpyrad é evidente que sua presença potencializou a ação do tolfenpyrad, pois as mesmas alterações morfológicas observadas no tratamento com tolfenpyrad dissolvido em acetona na concentração 50 µg/mL foram observadas no tratamento com tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo em uma concentração dez vezes menor (5 µg/mL) no mesmo período de tempo (após três dias do oferecimento do ingrediente ativo). Entretanto, o óleo de soja não potencializou a ação do diafentiurom, pois os primeiros sintomas de intoxicação foram observados no mesmo período de tempo para o ingrediente ativo dissolvido apenas em acetona e dissolvido em acetona + óleo na concentração 500 µg/mL.

Figura 10: Fotomicrografia de secções histológicas da glândula pós-faríngea de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com diafentiurom.

A-B - Grupo Controle: **A-** dieta dissolvida em acetona, **B -** dieta dissolvida em acetona + óleo. Epitélio glandular lobulado (**ep**) normal, com núcleos intactos (**n**) e nucléolos normais (**seta escura**). Citoplasma, cutícula (**cut**) e lúmen (**l**) sem alterações morfológicas. Escala = 20 µm.

C, D e E - Grupo tratado com diafentiurom dissolvido em acetona na concentração 500 µg/mL. Epitélio glandular (**ep**) mais espesso, além da presença de núcleos (**n**) com cromatina marginalizada (**seta branca**), núcleos picnóticos (**p**) e poucas vacuolizações citoplasmáticas (**seta escura**). Cutícula (**cut**) sem alterações morfológicas, porém, o lúmen (**I**) encontra-se reduzido. Escala = 20 µm.

F, G e H – Grupo tratado com diafentiurom dissolvido em acetona + óleo na concentração 500 µg/mL. Epitélio glandular (**ep**) mais espesso, além da presença de núcleos (**n**) com cromatina marginalizada (**seta branca**), núcleos picnóticos (**p**) e aumento considerável da quantidade de vacuolizações citoplasmáticas (**v**). Presença de gotas lipídicas (**seta escura**) no interior do citoplasma das células glandulares. Escala = 20 µm.

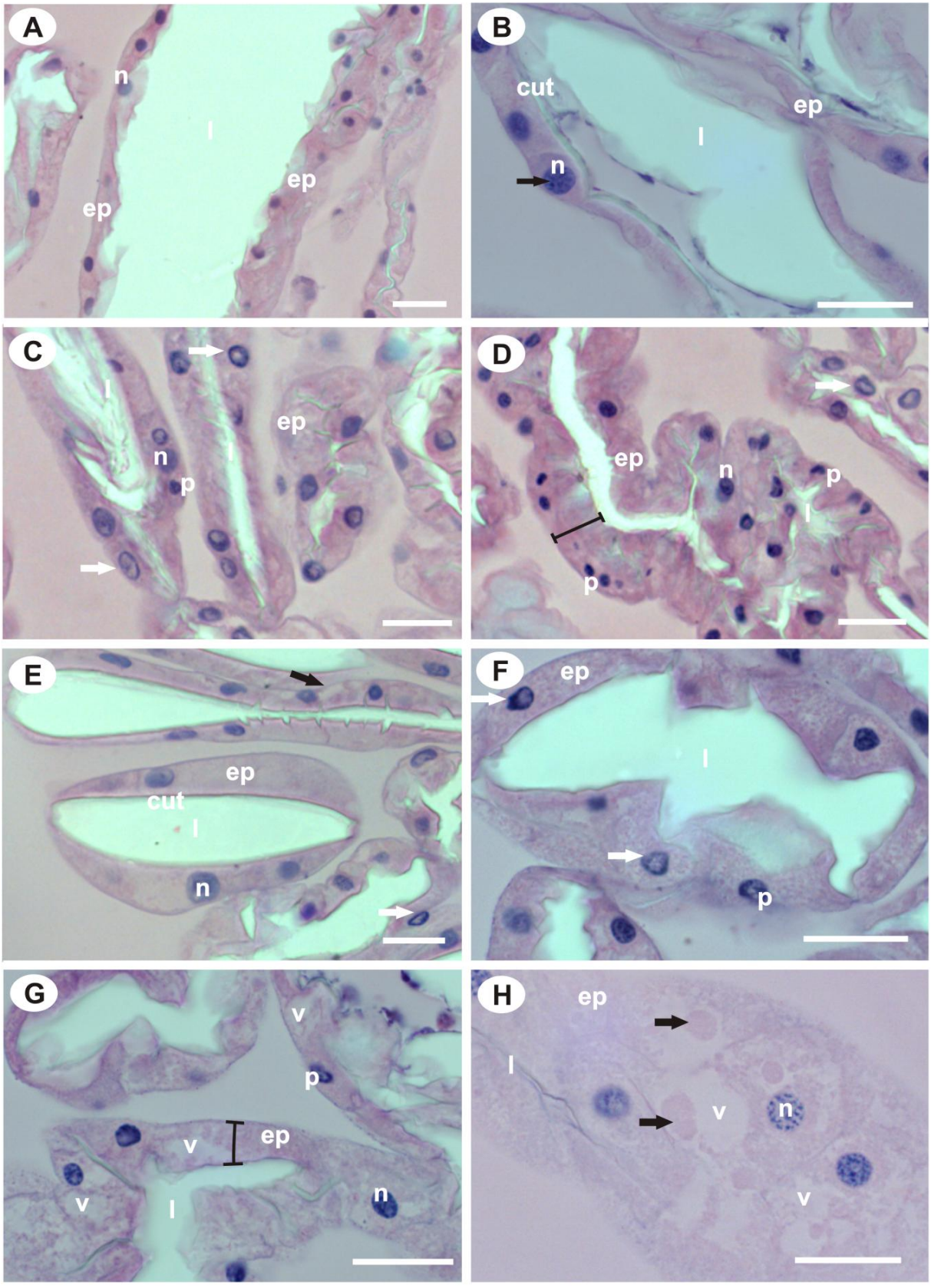

A
n
l
ep
ep
B
cut
ep
l
n
C
l
ep
n
l
p
D
ep
n
p
l
p
E
ep
cut
l
n
F
ep
l
p
G
v
p
v
ep
v
l
n
H
ep
l
v
n
v

Figura 10

Figura 11. Fotomicrografia de secções histológicas da glândula pós-faríngea de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com tolfenpyrad.

A-B - Grupo Controle. A- dieta dissolvida em acetona, **B -** dieta dissolvida em acetona + óleo. Epitélio glandular lobulado (**ep**) normal, com citoplasma celular e núcleos intactos (**n**), bem como cutícula (**cut**) e lúmen (**l**) sem alterações morfológicas. Escala = 20 µm.

C, D e E - Grupo tratado com tolfenpyrad dissolvido em acetona na concentração 50 µg/mL. Epitélio glandular (**ep**) mais espesso, além da presença de núcleos (**n**) picnóticos (**p**) e de poucas vacuolizações citoplasmáticas (**v**). Lúmen (**l**) sem conteúdo. Escala = 20 µm.

F, G e H – Grupo tratado com tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo na concentração 5 µg/mL. Epitélio glandular (**ep**) mais espesso, aumento considerável da quantidade de núcleos (**n**) com cromatina marginalizada (**seta branca**) e de núcleos picnóticos (**p**), bem como da quantidade de vacuolizações citoplasmáticas (**v**). Escala = 20 µm.

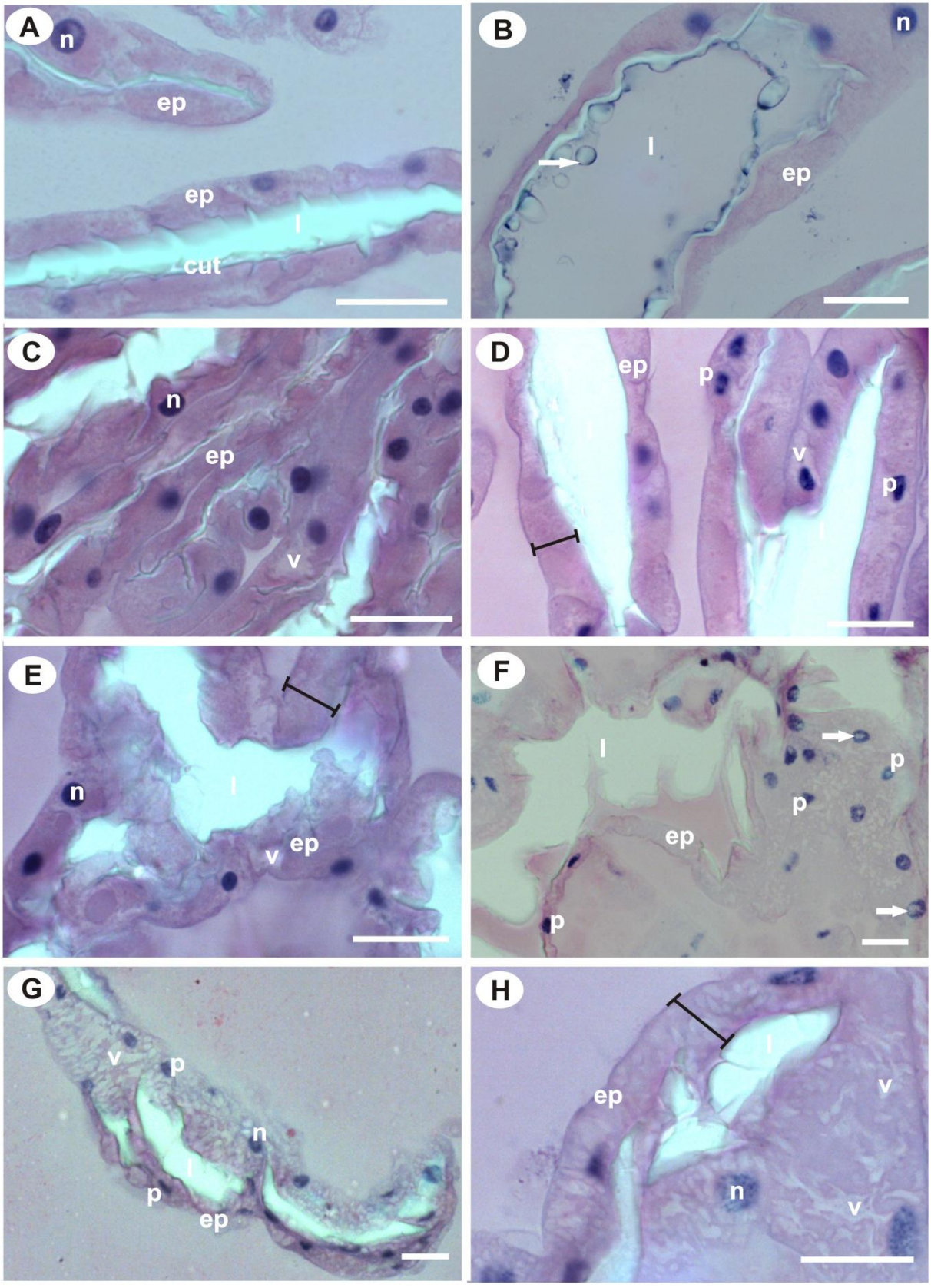

A
n
ep
ep
l
cut
B
n
l
ep
C
n
ep
v
D
ep
p
v
p
l
E
n
l
v
ep
F
l
p
p
ep
p
G
v
p
n
l
p
ep
H
l
ep
v
n
v

Figura 11

Figura 12. Fotomicrografia de secções histológicas do ventrículo de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com diafentiurom.

A-B – Grupo Controle. **A**- dieta dissolvida em acetona, **B** - dieta dissolvida em acetona + óleo. Epitélio ventricular (**ep**) com suas células regenerativas (ninhos de células regenerativas) (**rc**), células digestivas (**dc**) com núcleos intactos (**n**) e presença das *globet cells* (**gc**) e das vesículas de secreção (**ve**). O circulo tracejado mostra o óleo de soja próximo às *globet cells* (**gc**) e vesículas de secreção (**ve**) do epitélio ventricular, próximos ao lúmen (**l**). O epitélio ventricular está sobre a membrana basal (**seta branca**) e encontra-se recoberto por musculatura longitudinal (**seta escura**). Escala = 20 µm.

C, D e E – Grupo tratado com diafentiurom dissolvido em acetona na concentração 500 µg/mL. Epitélio ventricular (**ep**) com quantidade reduzida de células regenerativas (**rc**) e células digestivas (**dc**). Núcleos com picnose nuclear (**p**) e cromatina marginalizada (**seta branca**), poucas *globet cells* (**gc**) e vesículas de secreção (**ve**). Presença de vacúolos (**v**) no epitélio ventricular. Escala = 20 µm.

F, G e H – Grupo tratado com diafentiurom dissolvido em acetona + óleo na concentração 500 µg/mL. Epitélio ventricular (**ep**) com quantidade reduzida de células regenerativas (**rc**) e células digestivas (**dc**). Núcleos com picnose nuclear (**p**) e cromatina marginalizada (**seta branca**), poucas *globet cells* (**gc**) e vesículas de secreção (**ve**). Por outro lado, há grande quantidade de vacúolos (**v**) no epitélio ventricular. Escala = 20 µm.

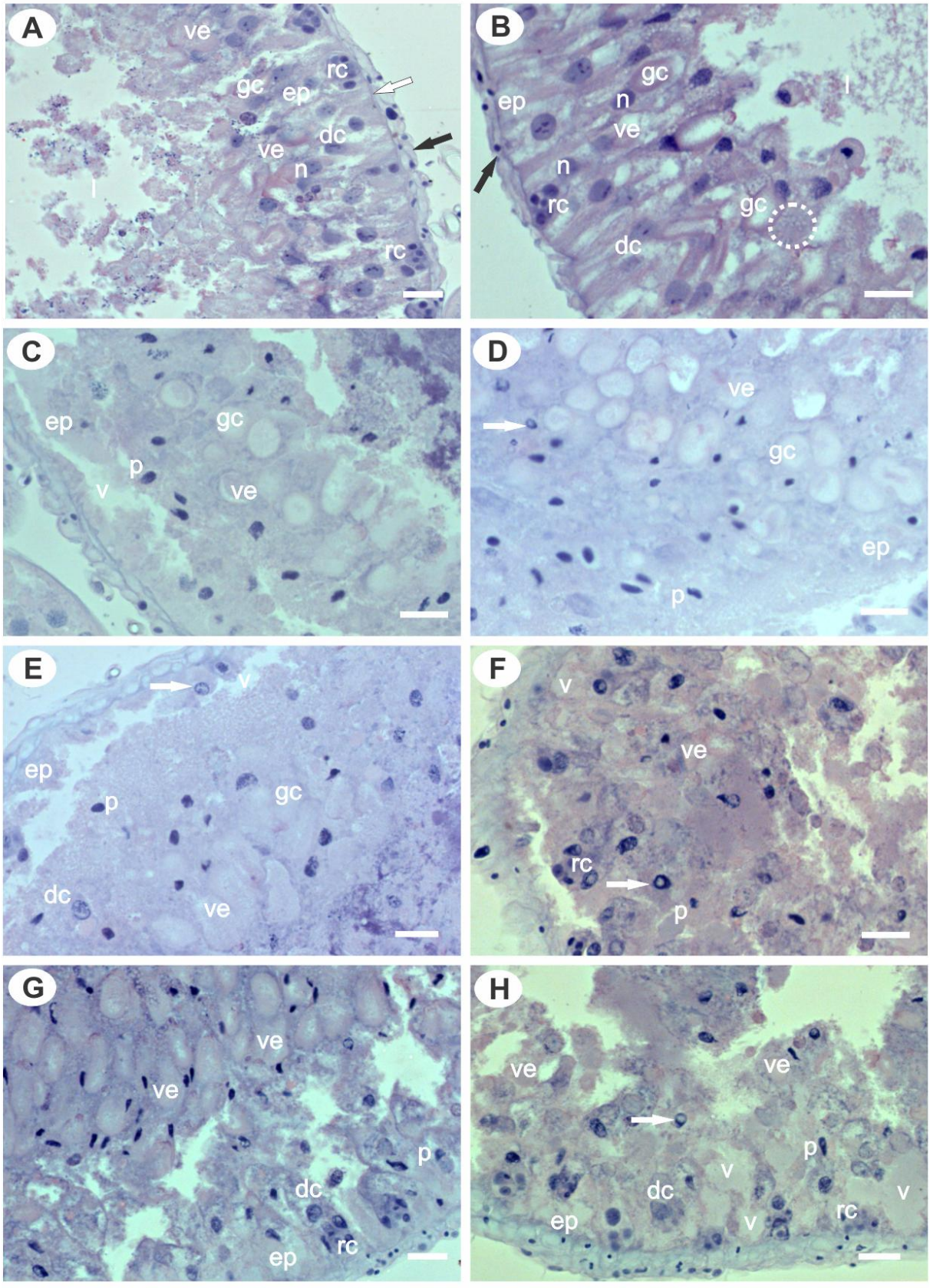

A
ve
gc
ep
rc
dc
ve
n
rc
B
ep
gc
n
ve
l
n
rc
gc
dc
C
ep
gc
p
v
ve
D
ve
gc
ep
p
E
v
ep
p
gc
dc
ve
F
v
ve
rc
p
G
ve
ve
p
dc
ep
rc
H
ve
ve
p
v
dc
v
ep
v
rc

Figura 12

Figura 13. Fotomicrografia de secções histológicas do ventrículo de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com tolfenpyrad.

Grupo Controle. **A**- dieta dissolvida em acetona, **B** - dieta dissolvida em acetona + óleo. Epitélio ventricular (**ep**) com suas células regenerativas (ninhos de células regenerativas) (**rc**), células digestivas (**dc**) com núcleos intactos (**n**) e presença das *globet cells* (**gc**) e das vesículas de secreção (**ve**). O epitélio ventricular está sobre a membrana basal (**seta branca**) e encontra-se recoberto por musculatura longitudinal (**seta escura**). Escala = 20 µm.

C, D e E – Grupo tratado com tolfenpyrad dissolvido em acetona na concentração 50 µg/mL. Epitélio ventricular (**ep**) com quantidade reduzida de células regenerativas (**rc**) e células digestivas (**dc**). Núcleos com picnose nuclear (**p**), poucas vesículas de secreção (**ve**) e de *globet cells* (**gc**). Presença de vacúolos (**v**) no epitélio ventricular. Escala = 20 µm.

F, G e H – Grupo tratado com tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo na concentração 5 µg/mL. Epitélio ventricular (**ep**) com redução acentuada na quantidade de células regenerativas (**rc**) e células digestivas (**dc**). Núcleos com picnose nuclear (**p**). Pouca quantidade de vesículas de secreção (**ve**), *globet cells* (**gc**) e de vacúolos (**v**) no epitélio ventricular. Presença de óleo de soja (**circulo tracejado**) próximo as *globet cells* (**gc**) e vesículas de secreção (**ve**) do epitélio ventricular. Observa-se a membrana basal (**seta branca**) e a musculatura longitudinal (seta escura). Escala= 20 µm.

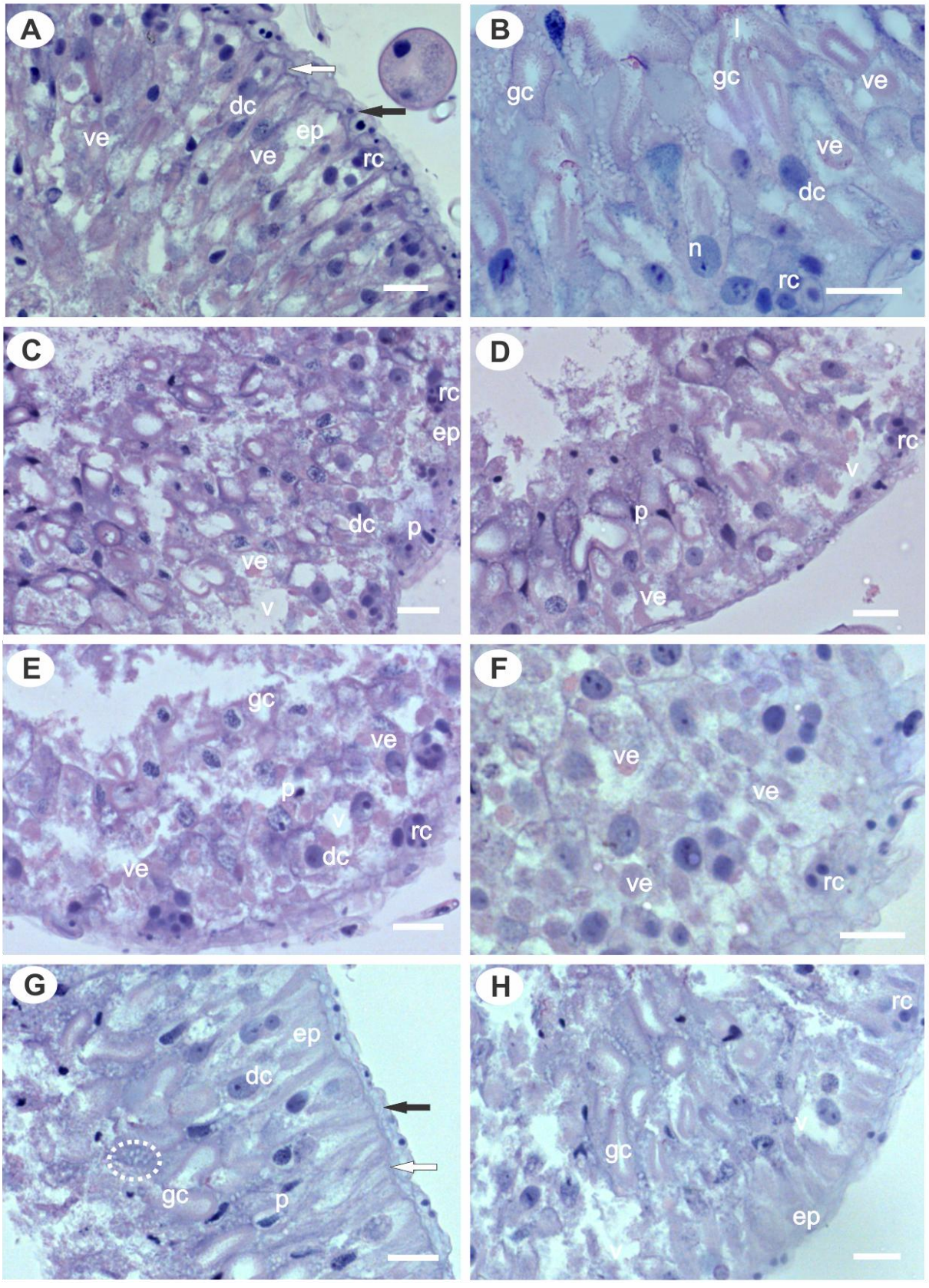

A
ve
dc
ve
ep
rc
B
gc
l
gc
ve
ve
dc
n
rc
C
rc
ep
dc
p
ve
v
D
rc
v
p
ve
E
gc
ve
p
v
rc
dc
ve
F
ve
ve
ve
rc
G
ep
dc
gc
p
H
rc
v
gc
ep
v

Figura 13

Figura 14. Fotomicrografia de secções histológicas dos túbulos de Malpighi de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com diafentiurom.

A-B – Grupo Controle. **A-** dieta dissolvida em acetona, **B -** dieta dissolvida em acetona + óleo. Núcleos (**n**) e nucléolos intactos (**seta escura**), além de grânulos mineralizados (**seta branca**) no interior das células epiteliais. Em corte transversal é possível notar o lúmen (**l**). Escala = 20 μm.

C, D e E – Grupo tratado com diafentiurom dissolvido em acetona na concentração 500 μg/mL. Presença de núcleos picnóticos (**p**), núcleos com cromatina marginalizada (**seta escura**) e vacuolizações citoplasmáticas (**v**). Aumento da quantidade e do tamanho dos grânulos mineralizados (**seta branca**). Escala = 20 μm.

F, G e H – Grupo tratado com diafentiurom dissolvido em acetona + óleo na concentração 500 μg/mL. Presença de muitos núcleos intactos (**n**) e alguns núcleos picnóticos (**p**), bem como núcleos com cromatina marginalizada (**seta escura**). Aumento considerável da quantidade e do tamanho dos grânulos mineralizados (**seta branca**). Escala = 20 μm.

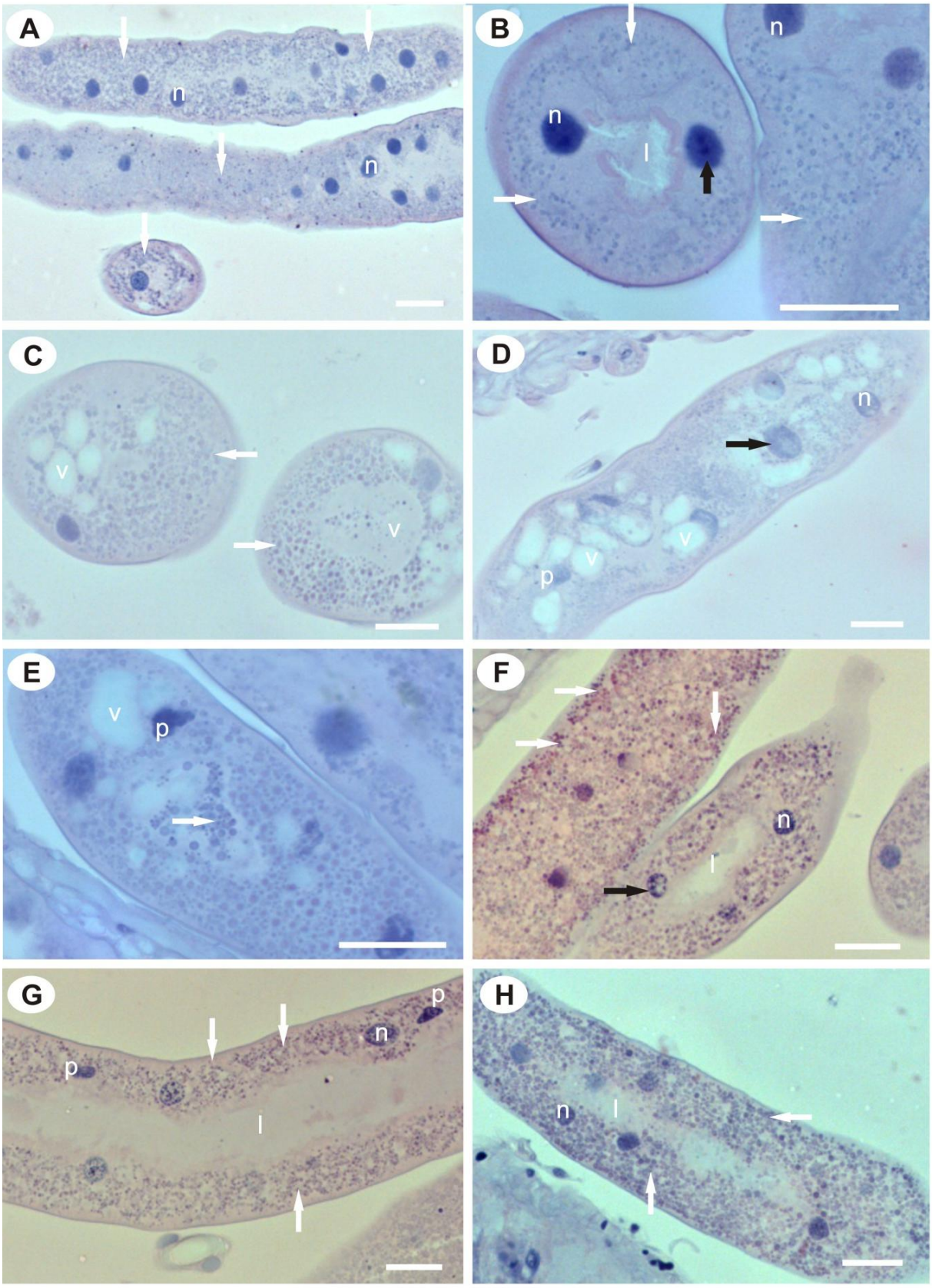


Figura 14

Figura 15 Fotomicrografia de secções histológicas dos túbulos de Malpighi de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com tolfenpyrad.

A-B – Grupo Controle. **A-** dieta dissolvida em acetona, **B -** dieta dissolvida em acetona + óleo. Núcleos (**n**) e nucléolos intactos (**seta escura**), além de grânulos mineralizados (**seta branca**) no interior das células epiteliais. Em corte longitudinal é possível notar o lúmen (**l**). Escala = 20 μm.

C, D e E – Grupo tratado com tolfenpyrad dissolvido em acetona na concentração 50 μg/mL. Presença de núcleos picnóticos (**p**) e vacuolizações citoplasmáticas (**v**), além de aumento da quantidade e do tamanho dos grânulos mineralizados (**seta branca**). Escala = 20 μm.

F, G e H – Grupo tratado com tolfenpyrad dissolvido em acetona + óleo na concentração 5 μg/mL. Em cortes realizados próximos a região de inserção do ventrículo é possível notar núcleos intactos (**n**), núcleos picnóticos (**p**) e poucos grânulos mineralizados (**seta branca**). Além disso, há também muitas vacuolizações citoplasmáticas (**v**). Escala = 20 μm.

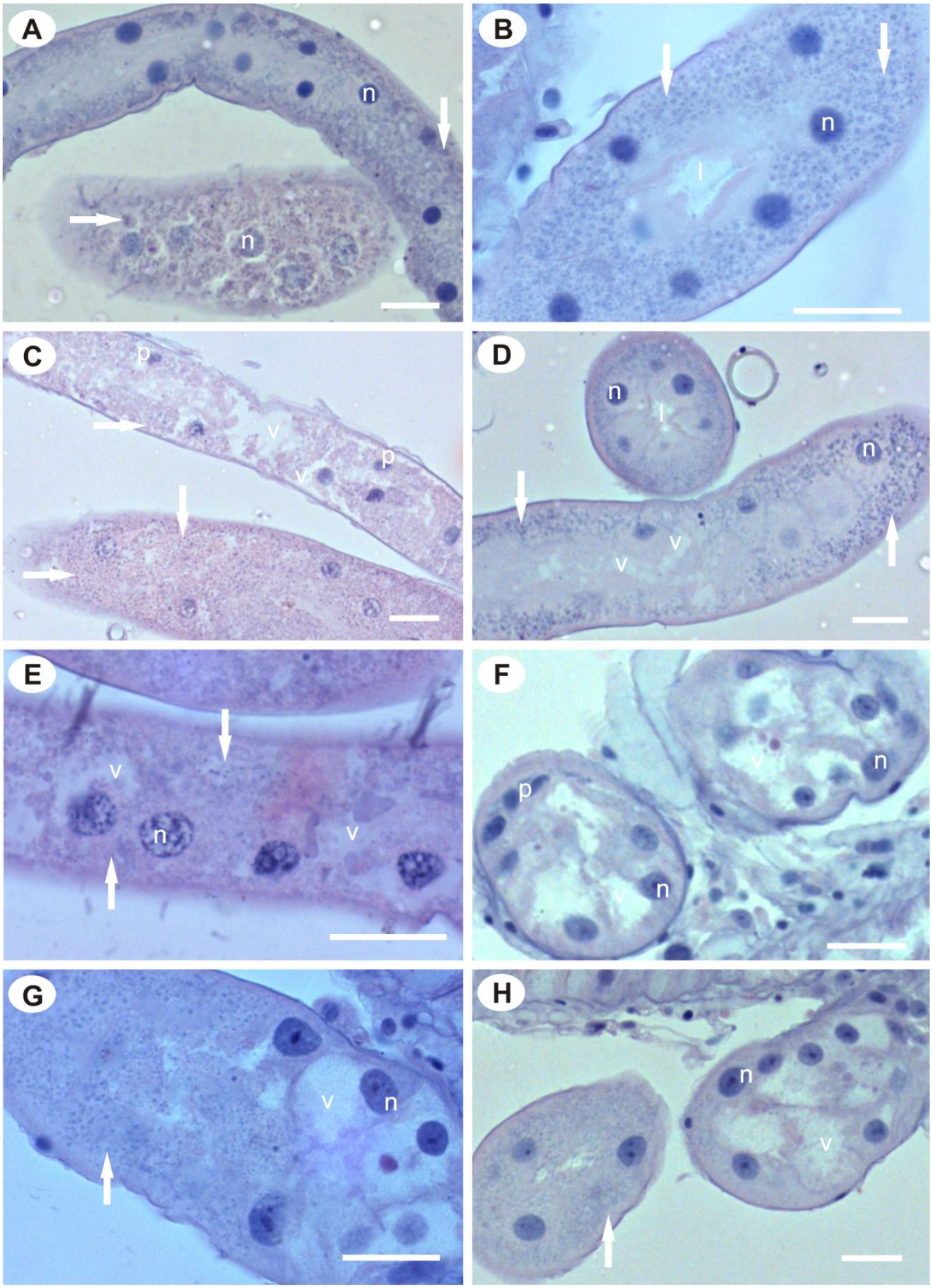


Figura 15

4.3. Avaliação de iscas em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório

4.3.1. Diafentiurom

4.3.1.1. Aceitação das iscas

A aceitação das iscas pelas colônias incipientes de *A. sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório está representada na figura 16 através das porcentagens de carregamento, incorporação no jardim de fungo e devolução das iscas após um período de 24 horas de seu oferecimento.

O carregamento das iscas contendo diafentiurom nas concentrações 0.5% e 1% foi total e todo material carregado foi incorporado no jardim de fungo. Para a isca na concentração 5%, o carregamento foi de 93.75% e não houve devolução do material. O mesmo ocorreu para a isca controle, que apresentou carregamento de 97.5% e incorporação total do material no jardim de fungo. A isca Mirex-S Max® foi carregada totalmente, porém, apenas 68.75% do material carregado foram incorporados no jardim de fungo e 31.25% foram devolvidos.

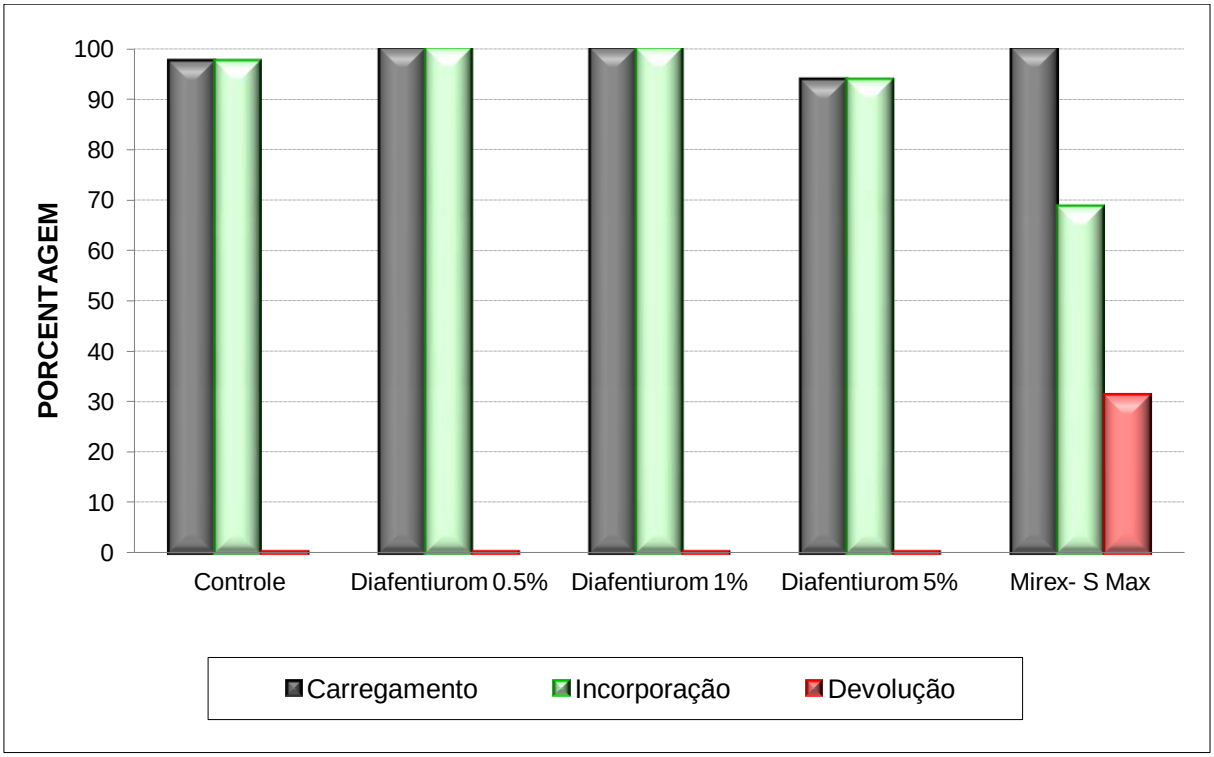


Figura 16: Carregamento, incorporação no jardim de fungo e devolução de iscas em colônias incipientes de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório e tratadas com iscas contendo diafentiurom.

4.3.1.2. Intoxicação das formigas

As formigas que receberam isca controle (sem ingrediente ativo) não apresentaram sintomas de intoxicação durante os 21 dias de experimento. Comportamento semelhante foi observado para as formigas tratadas com iscas contendo diafentiurom nas concentrações 0.5%, 1% e 5%.

Os sintomas de intoxicação das formigas tratadas com iscas Mirex-S Max® foram observados a partir do segundo dia de experimento e a intoxicação total das formigas ocorreu em 5 dias. Os principais sintomas de intoxicação apresentados pelas formigas foram dificuldade de locomoção devido aos tremores nas pernas e imobilidade, com o último par de pernas estendido para cima.

4.3.1.3. Corte de folhas

Não houve redução no corte de folhas para o tratamento com a isca controle. As formigas tratadas com iscas contendo diafentiurom também não interromperam o corte e mais de 87% das folhas foram cortadas diariamente em todas as concentrações testadas. Contudo, as formigas tratadas com iscas Mirex-S Max® interromperam o corte de folhas imediatamente.

4.3.1.4. Mortalidade de formigas

As colônias tratadas com isca controle não apresentaram mortalidade de formigas durante os 21 dias de experimento. O mesmo ocorreu para os tratamentos com as iscas contendo diafentiurom, onde não foram observadas formigas mortas em nenhuma das concentrações testadas. As colônias que receberam as iscas Mirex-S Max® apresentaram mortalidade de formigas a partir do terceiro dia de experimento e a mortalidade total ocorreu no sexto dia.

4.3.1.5. Corte de fungo

As colônias tratadas com isca controle, iscas contendo diafentiurom e iscas Mirex-S Max® não apresentaram corte do jardim de fungo.

4.3.1.6. Mudança de panela de fungo

Nas colônias tratadas com isca controle, iscas contendo diafentiurom e iscas Mirex-S Max® as formigas não mudaram o jardim de fungo de panela (câmara).

4.3.1.7. Redução no jardim de fungo

Não ocorreu redução no jardim de fungo nas colônias tratadas com isca controle, iscas contendo diafentiurom e iscas Mirex-S Max®.

4.3.1.8. Rainha morta

Não houve mortalidade de rainha nas colônias tratadas com isca controle, iscas contendo diafentiurom e iscas Mirex-S Max® durante o período observado.

4.3.1.9. Presença de fungos filamentosos

Nenhuma colônia tratada com isca controle e iscas contendo diafentiurom apresentou fungos filamentosos. As colônias tratadas com iscas Mirex-S Max® apresentaram 50% de suas colônias contaminadas no 3º dia de experimento, atingindo sua totalidade no 5º dia.

4.3.1.10. Condições das colônias

A avaliação das condições gerais das colônias foi baseada nas observações de formigas mortas, mudanças no aspecto do jardim de fungo e presença de gotículas de água nas tampas dos recipientes. As colônias que receberam isca controle e iscas contendo diafentiurom incorporaram o material no jardim de fungo e não sofreram nenhuma regressão até o término do experimento. As colônias tratadas com iscas Mirex-S Max® apresentaram regressão a partir do 2º dia de experimento e se extinguiram no 6º dia.

Os resultados obtidos mostraram que as iscas contendo diafentiurom não foram eficientes no controle de colônias incipientes de *A. sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório e, portanto, os testes com iscas em colônias de campo não foram realizados.

4.3.2. Tolfenpyrad

4.3.2.1. Aceitação das iscas

A aceitação das iscas pelas colônias incipientes de *A. sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório está representada na figura 17 através das porcentagens de carregamento, incorporação no jardim de fungo e devolução das iscas após um período de 24 horas de seu oferecimento.

O carregamento da isca controle foi de 97.5% e todo o material carregado foi incorporado no jardim de fungo. Para as iscas contendo tolfenpyrad, o carregamento variou entre 56.25% a 76.25%, sendo que quanto maior a concentração testada menor foi o carregamento e a incorporação no jardim de fungo, indicando que a presença do ingrediente ativo pode ter reduzido a atratividade das iscas às operárias.

A isca Mirex-S Max® foi carregada totalmente, porém, apenas 68.75% do material carregado foram incorporados no jardim de fungo e 31.25% foram devolvidos.

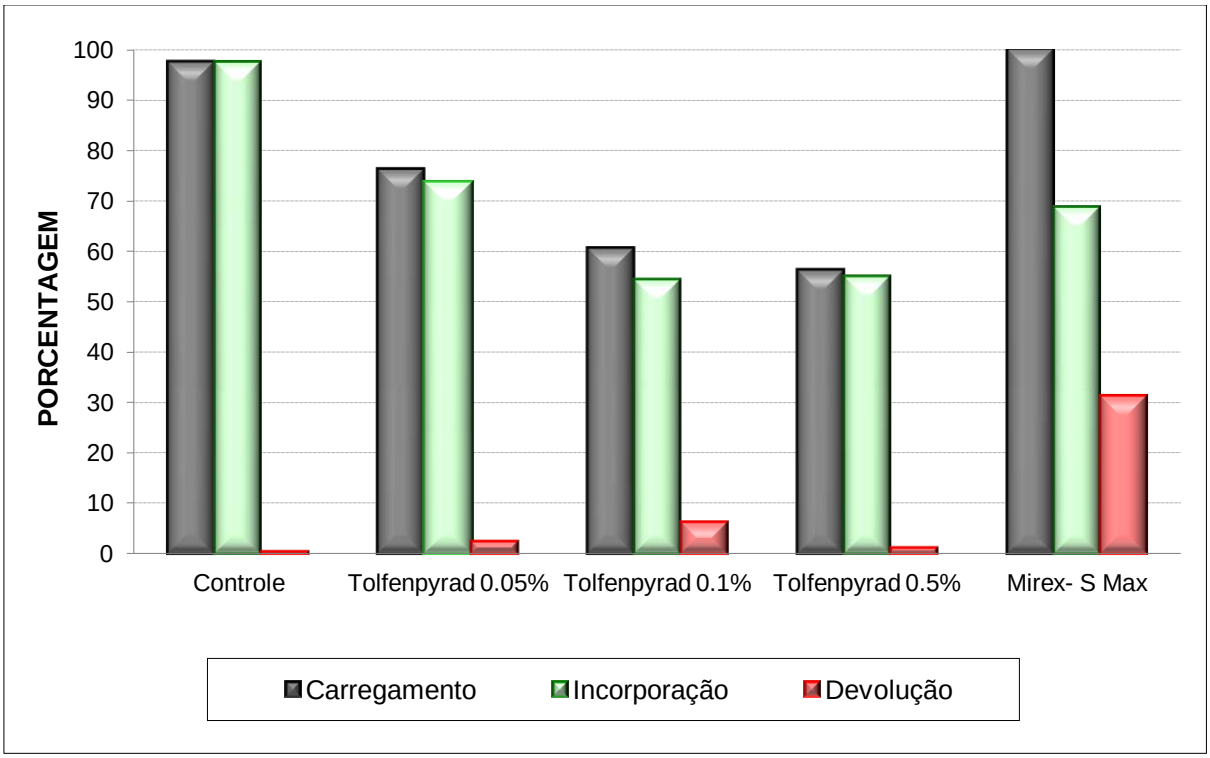


Figura 17: Carregamento, incorporação no jardim de fungo e devolução de iscas em colônias incipientes de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório e tratadas com iscas contendo tolfenpyrad.

4.3.2.2. Intoxicação das formigas

As formigas que receberam isca controle (sem ingrediente ativo) não apresentaram sintomas de intoxicação durante os 21 dias de experimento. Comportamento semelhante foi observado para as formigas tratadas com iscas contendo tolfenpyrad na concentração 0.05%.

As formigas tratadas com iscas contendo tolfenpyrad nas concentrações 0.1% e 0.5% apresentaram sintomas de intoxicação (imobilidade) no 2º e 3º dias de experimento. Entretanto, os sintomas desapareceram a partir do 4º dia.

Os sintomas de intoxicação das formigas tratadas com iscas Mirex-S Max® foram observados a partir do segundo dia de experimento e a intoxicação total das formigas ocorreu em 5 dias. Os principais sintomas de intoxicação apresentados pelas formigas foram dificuldade de locomoção devido aos tremores nas pernas e imobilidade, com o último par de pernas estendido para cima (Figura 18).

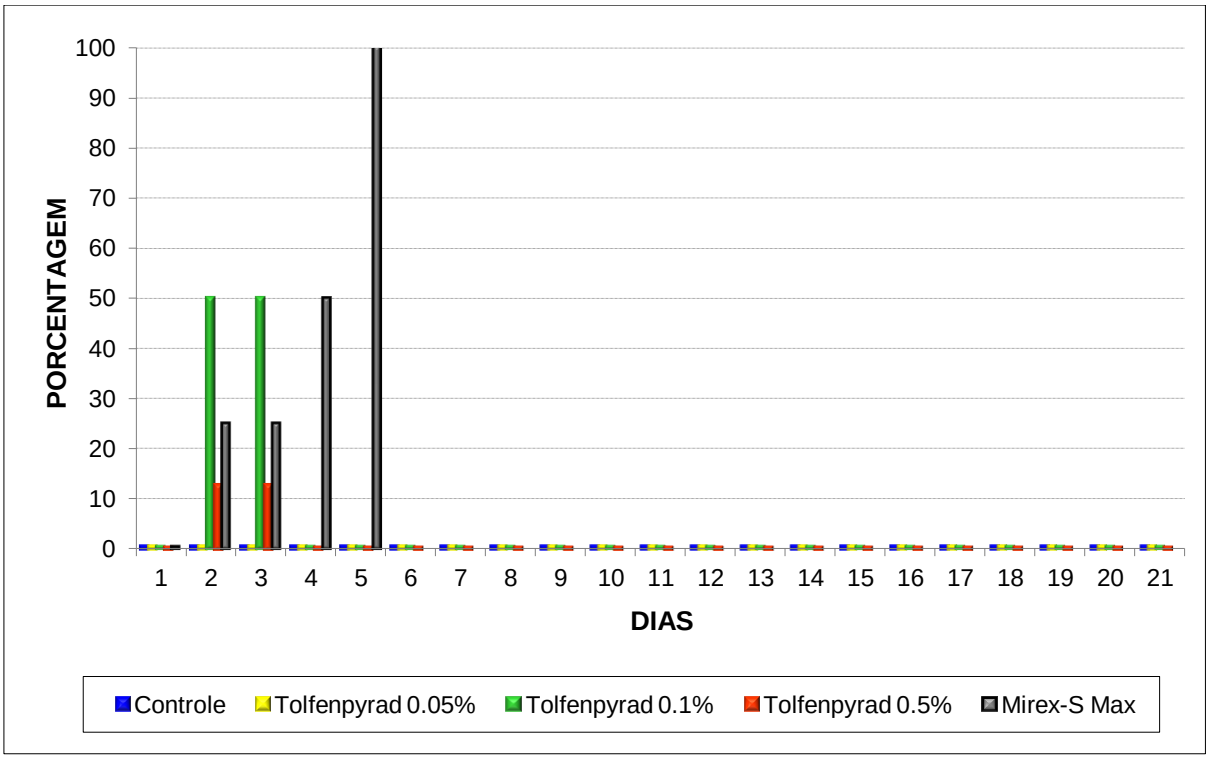


Figura 18: Intoxicação de formigas em colônias incipientes de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório e tratadas com iscas contendo tolfenpyrad.

4.3.2.3. Corte de folhas

Não houve redução no corte de folhas para o tratamento com a isca controle. As formigas tratadas com iscas contendo tolfenpyrad também não interromperam o corte e 100%

das folhas foram cortadas diariamente em todas as concentrações testadas. Contudo, as formigas tratadas com iscas Mirex-S Max® interromperam o corte de folhas imediatamente.

4.3.2.4. Mortalidade de formigas

As colônias tratadas com isca controle não apresentaram mortalidade de formigas durante os 21 dias de experimento. Os tratamentos com iscas contendo tolfenpyrad apresentaram pequena mortalidade no segundo dia: 7.5% para a concentração 0.05%, 18.75% para a concentração 0.1% e 6.25% para a concentração 0.5%. Entretanto, a mortalidade não aumentou nos demais dias de experimento.

As colônias que receberam as iscas Mirex-S Max® apresentaram mortalidade de formigas a partir do terceiro dia de experimento e a mortalidade total ocorreu no sexto dia (Figura 19).

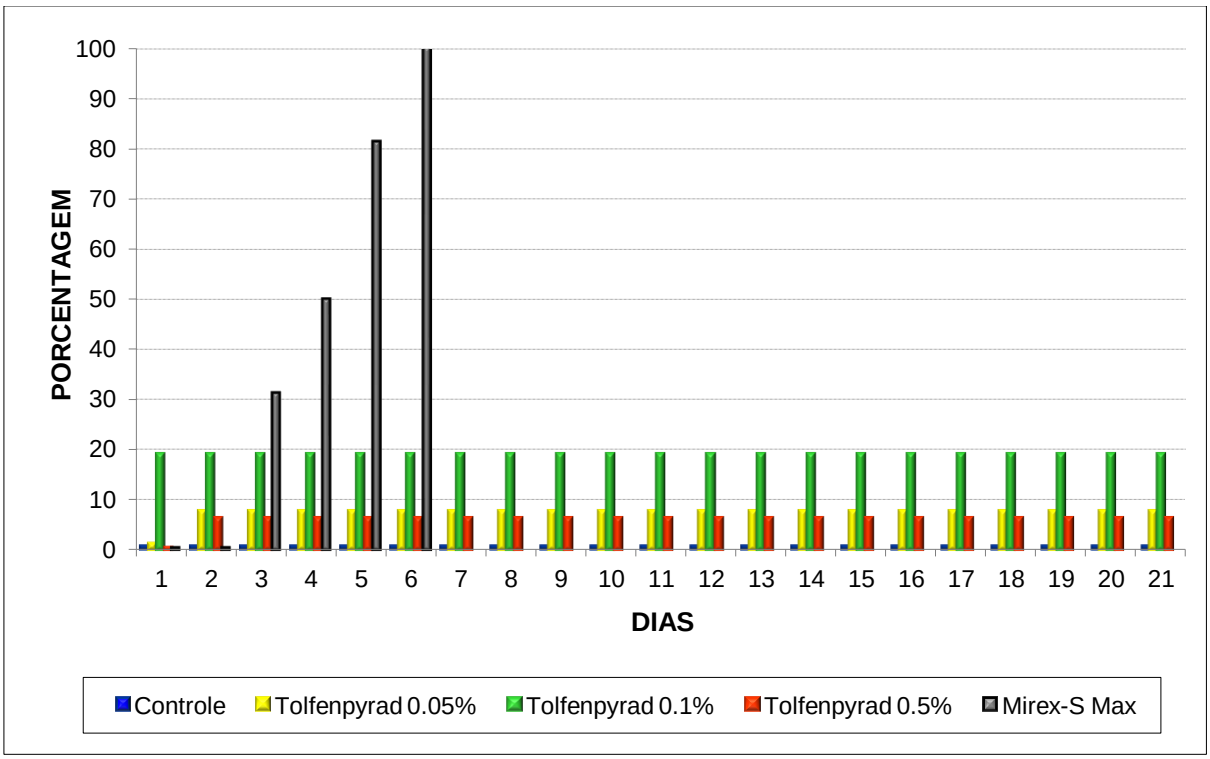


Figura 19: Mortalidade de formigas em colônias incipientes de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório e tratadas com iscas contendo tolfenpyrad.

4.3.2.5. Corte de fungo

As colônias tratadas com isca controle, iscas contendo tolfenpyrad e iscas Mirex-S Max® não apresentaram corte do jardim de fungo.

4.3.2.6. Mudança de panela de fungo

Nas colônias tratadas com isca controle, iscas contendo tolfenpyrad e iscas Mirex-S Max® as formigas não mudaram o jardim de fungo de panela (câmara).

4.3.2.7. Redução no jardim de fungo

Não ocorreu redução no jardim de fungo nas colônias tratadas com iscas contendo tolfenpyrad e iscas Mirex-S Max®.

4.3.2.8. Rainha morta

Não houve mortalidade de rainha nas colônias tratadas com isca controle, iscas contendo tolfenpyrad e iscas Mirex-S Max® durante o período observado.

4.3.2.9. Presença de fungos filamentosos

Nenhuma colônia tratada com isca controle e iscas contendo tolfenpyrad apresentou fungos filamentosos. As colônias tratadas com iscas Mirex-S Max® apresentaram 50% de suas colônias contaminadas no 3º dia de experimento, atingindo sua totalidade no 5º dia.

4.3.2.10. Condições das colônias

A avaliação das condições gerais das colônias foi baseada nas observações de formigas mortas, mudanças no aspecto do jardim de fungo e presença de gotículas de água nas tampas dos recipientes. As colônias que receberam isca controle e iscas contendo tolfenpyrad incorporaram o material no jardim de fungo e não sofreram nenhuma regressão até o término do experimento. As colônias tratadas com iscas Mirex-S Max® apresentaram regressão a partir do 2º dia de experimento e se extinguiram no 6º dia.

Os resultados obtidos mostraram que as iscas contendo tolfenpyrad não foram eficientes no controle de colônias incipientes de *A. sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório e, portanto, os testes com iscas em colônias de campo não foram realizados.

O diafentiurom e o tolfenpyrad apresentaram toxicidade às operárias de *A. sexdens rubropilosa* isoladas do formigueiro. Contudo, quando foram incorporados em iscas não apresentaram resultados satisfatórios no controle de colônias incipientes de *A. sexdens*

rubropilosa. As colônias que receberam as iscas incorporaram todo o material no jardim de fungo e não sofreram regressão até o término do experimento. Além disso, foi possível observar que as iscas contendo tolfenpyrad não foram atrativas às operárias, sendo que quanto maior a concentração testada, menor foi o carregamento. Contudo, o fato do diafentiurom e do tolfenpyrad não apresentarem resultados satisfatórios para o uso em iscas não descarta o potencial desses ingredientes ativos para o uso na termonebulização e esses resultados devem ser avaliados.

Poucas são as pesquisas que visam o desenvolvimento de iscas com novos ingredientes ativos para o controle de formigas-cortadeiras. A maioria dos trabalhos publicados utiliza-se de iscas já comercializadas para a realização de testes em colônias incipientes mantidas em laboratório e, principalmente, em colônias de campo (LINK et al., 1995; ZANETTI et al., 2003; ZANUNCIO et al., 1993).

Bueno (2005a) confeccionou iscas a base de polpa cítrica e óleo de soja contendo hidrametilnona nas concentrações 0.5%, 0.75%, 1% e 2% e testou em colônias incipientes de *A. sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório. As iscas nas concentrações 1% e 2% apresentaram resultados semelhantes aos do controle positivo Mirex-S Max, mostrando-se promissoras para serem testadas em colônias de campo. Como os resultados entre as concentrações 1% e 2% foram muito semelhantes, apenas a concentração 1% foi testada em campo e os resultados obtidos demonstraram que a hidrametilnona foi tão eficiente quanto a sulfluramida (Mirex-S Max) no controle de colônias adultas de *A. sexdens rubropilosa*, com eficiência superior a 80%, considerada satisfatória para testes de eficácia (BRASIL, 2013). Porém, por se tratar de uma molécula antiga e que necessita de revisão nas avaliações toxicológicas para modificação do registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as empresas produtoras de iscas formicidas não apresentaram interesse em registrá-la e ainda continuam em busca de moléculas mais atuais para substituir a sulfluramida.

5. CONCLUSÕES

♣ O diafentiurom e do tolfenpyrad provocam toxicidade às operárias de *A. sexdens rubropilosa*, principalmente na presença do óleo de soja.

♣ A ingestão dos ingredientes ativos diafentiurom e tolfenpyrad provoca alterações morfológicas nas glândulas pós-faríngeas, no ventrículo e nos túbulos de Malpighi de operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

♣ As iscas contendo diafentiurom e tolfenpyrad não são eficientes no controle de colônias incipientes de *A. sexdens rubropilosa* e não devem ser indicadas para o controle de formigas-cortadeiras.

6. REFERÊNCIAS

AGOSTI, D., JOHNSON, N. F. Editors. 2013. Antbase. World Wide Web electronic publication. antbase.org, version (05/2013).

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Histo-anatomia de glândulas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 34, n. 4, p. 321- 329, 1967.

AMANTE, E. A formiga saúva *Atta capiguara*, praga das pastagens. **O Biológico**, São Paulo, v. 33, n. 6, 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.; FORTI, L.C.; MOREIRA, A.A.; BOARETTO, M.A.C.; RAMOS, V.M.; MATOS, C.A.O. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for simbiont fungus culture. **Sociobiology**, Chico, v. 40, n. 2, p. 293-306, 2002.

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: Folha de Viçosa, 1993. Cap. 14, p. 212-241.

ANJOS, N.; DELLA LUCIA, T.M.C.; MAYHÉ-NUNES, A.J. **Guia prático sobre formigas cortadeiras em reflorestamentos**. Ponte Nova: Graff Cor, 1998. 97p.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Agrotóxicos e toxicologia**: Monografias de agrotóxicos. Disponível em: <http://www.portal.anvisa.gov.br> Acesso em: 06 mai. 2013.

ARAÚJO, M.S.; DELLA-LUCIA, T.M.C.; SOUZA, D.J. Estratégias alternativas de controle de formigas-cortadeiras. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 6, n. 1, p. 71 - 74, 2003.

AYRE, G.L. Feeding behaviour and digestion in *Camponotus herculeanus* (L.) (Hymenoptera: Formicidae). **Entomologia Experimentalis et Aplicata**, v. 6, p. 165- 170, 1963.

BAGNÈRES, A.G.; MORGAN, E.D. The post-pharyngeal glands and the cuticule of Formicidae contain the same characteristic hydrocarbons. **Experientia**, v.47, p.106-111, 1991.

BILLEN, J.; SCHOETERS, E. The post-pharyngeal gland in *Dinoponera* ants (Hymenoptera: Formicidae): Unusual morphology and changes during the secretory process. **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, v. 25, n. 4, p. 443-447, 1996.

BILLINGSLEY, P.F., DOWNE, T.R. The effects of artificial diets on the anterior intestinal cell ultrastructure of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **International Journal for Parasitology**, v. 1, n. 3, p. 291-299, 1989.

BOLTON, B. Synopsis and classification of formicidae. **Memoris of the American Entomological Institute**, v.71, p.1-370, 2003.

BOLTON, B.; ALPERT, G.; WARD, P.S.; NASKRECKI, P. (Eds.). Bolton's catalogue of ants of the world. 1758-2005. Cambridge: Harvard University Press, 2006. CD-ROM.

BOWEN, I.D.; BOWEN, S.M. **Programmed cell death in tumours and tissues**. London: Chapman and Hall, 1990. 268p.

BOWEN, I.D.; BOWEN, S.M.; JONES A.H. **Mitosis and Apopotosis: matters of life and death**. London: Chapman and Hall, 1998. 240p.

BRADLEY, T.J. The excretory system: structure and physiology. In: KERKUT, G.A, GILBERT, L. (Eds.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 4, p.421- 465.

BRAECKMAN, B.; BRYS, K.; RZEZNIK, U.; RAES, H. Cadmium pathology in an insect cell line: ultrastructural and biochemical effects. **Tissue & Cell**, Siena, v. 31, n. 1, p. 45-53, 1999.

BRANDÃO, C.R.F.; MAYHÉ-NUNES, A.J.; SANHUDO, C.E.D. Taxonomia e Filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo**. Viçosa: UFV, 2011. p. 27-48.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Toxicologia**: Legislação de produtos agrotóxicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/legis/index.html> Acesso em: 08 mar. 2013.

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

BUENO, F.C. **Seleção de ingredientes ativos para o controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae)**. 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005a.

BUENO, F.C.; FORTI , L.C.; BUENO, O.C. Toxicity of hydramethylnon to leaf-cutting na *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Feira de Santana, *in press*, 2013.

BUENO, O.C. **Filtro infrabucal e glândulas pós-faríngeas da saúva-limão** *Atta sexdens rubropilosa* **Forel (Hymenoptera, Formicidae)**. 107f. Tese (Livre-Docência) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita filho", Rio Claro, 2005b.

BUENO, O.C.; MORINI, M.S.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A.; SILVA, O.A. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dieta artificial. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 26, p. 107-113, 1997.

BUENO, O.C.; CAMPOS-FARINHA, A.E.C. As formigas domésticas. In: MARICONI, F.A.M. (Ed.). **Insetos e outros invasores de residência**. Piracicaba: FEALQ, 1999. p. 135-180.

BUENO, O.C.; BUENO, F.C.; DINIZ, E.A.; SCHNEIDER, M.O. Utilização de alimento pelas formigas-cortadeiras. In: Vilela, F.C. et al. (eds). **Insetos Sociais**: Da Biologia à Aplicação. Viçosa: Editora UFV, 2008. p 96-114.

CAETANO, F.H. **Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da sub-família Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae)**, 1977. 142f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1977.

CAETANO, F. H. **Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera: Formicidae)**, 1981. 171f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1981.

CAETANO, F.H. Presence of cuticular spines in proctodeo of ants *Paraponera clavata* and *Dinoptera australis* (Hymenoptera: Ponerinae). In: **INTERNATIONAL CONGRESS OF CELL BIOLOGY**, 4, 1988, Montreal, Canadá. Résumes.

CAETANO, F.H. **Aspectos ultramorfológicos, ultra estruturais e enzimológicos da glândula pós-faríngea de *Dinoponera australis* (Formicidae: Ponerinae).** 137f. Tese (Livre Docência) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita filho", Rio Claro, 1998.

CAETANO, F.H.; MACHADO, V.L.L. Morfologia e histologia do trato digestivo de *Protopolybia exigua exígua* (Hymenoptera: Vespidae) e suas estruturas excretoras anexas. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v.34, n. 25, p.283-96. 1982.

CAETANO, F.H.; CRUZ-LANDIM, C. Ultra-estrutura das células colunares do ventrículo de *Camponotus arboreus* (Hymenoptera : Formicidae) e suas implicações funcionais. **Naturalia**, v. 8, p. 91-100, 1983.

CAETANO, F.H.; OVERAL, W.L. Estudos do trato digestivo de vespas (Hymenoptera : Vespidae) e estruturas excretoras associadas. I. Morfologia. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.28, n.4, p. 403 - 408, 1984.

CAETANO, F.H.; TORRES, A.H.; CAMARGO, M.M.I.; TOMOTAKE, M.E.M. Apocrine secretion in the ant *Pachycondyla striata* ventriculus (Formicidae: Ponerinae). **Journal of Hymenoptera Research**, v. 10, p. 251-260, 1994.

CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F.J. **Formigas: Biologia e Anatomia**. Rio Claro: Editora Topázio, 2002. 131p.

CAVALCANTE, V.M.; CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. **Naturalia**, v 24: p 19-40, 1999.

CECCATO, M. **Inibidores da respiração celular no controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae).** 2010. 49f. Monografia (Especialização em Entomologia Urbana) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

CHAPMAN, R.F. **The Insects: structure and function**. New York: American Elsevier. 1975. 819p.

CHAPMAN, R.F. Structure of the digestive systems. In: KERKUT, G. A. and GILBERT, L. I. (Eds.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, Oxford, United Kingdom: Pergamon Press, 1985. v. 4. p. 165-211.

CHERRETT, J. M. The foraging behaviour of *Atta cephalotes* L. (Hymenoptera: Formidae). L. Foraging patterns and plant species attacked in tropical rain forest. **Journal of Animal Ecology**, London, v. 37, p. 387- 403, 1968.

CHERRETT, J.M.; PEREGRINE, D.J. A review of the status of leaf-cutting ants and their control. **Proceedings of the Association of Applied Biologists**, v. 84, n. 1, p. 124-128, 1976.

CHERRETT, J.M. Chemical control and bait formulations for leaf-cutting ants. In: LOFGREN, C.S.; VANDER MEER, R.K. (Ed.). **Fire ants and leaf-cutting ants**: biology and management. Boulder: Westview Press, 1986a. p. 57-377.

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

CHERRETT, J.M. The economic importance and control of leaf-cutting ants. In: VINSON, S.B. (Ed.). **Economic impact and control of social insects**. New York: Pragger Publishers, 1986c. p. 165-192.

CORBETT, J.R.; K.WRIGHT; A.C. BAILLIE. 1984. **The biochemical mode of action of pesticides**. London, Academic Press, 382 p.

CRUZ-LANDIM, C. Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. IN: Biologia Celular. Aciesp. **Anais da Academia de Ciências do Estado de São Paulo**, v. 44, p. 28-49, 1985.

CRUZ-LANDIM, C.; MOTA, M.H.V. Occurrence of tegumentary glands in stingless bees. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). In: VEERESH, G.K.; MALLIK, B.; VIRAKTAMATH, C.A. (eds.). **Social insects and the environment.** New Delhi, Oxford & IBH Publishing Co, 1990, 765p.

DECIO, P.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; BUENO, F.C; BUENO O.C. Toxicological and histopathological effects of hydramethylnon on *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers. **Micron**, v. 45, p. 22-31, 2013.

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

DELABIE, J.H.C. Novas opções para o controle das formigas cortadeiras, Acromyrmex subterraneus brunneus e Atta sexdens sexdens (Hymenoptera: Formicidae: Attini), na região cacaueira da Bahia, Brasil. **Agrotrópica**, v.1, n.3, p. 173-180, 1989.

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

DELABIE, J.H.C.; ALVES, H.S.R.; REUSS-STRENZEL, G.M.; CARMO, A.F.R.; NASCIMENTO, I.C. Distribuição das Formigas-Cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no Novo Mundo. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo**. Viçosa: UFV, 2011. p. 80-101.

DELAGE-DARCHEN, B. Les glandes post-pharyngiennes des fourmis connaissances actuellessur leur structure, leur fonctionnement, leur rôle. **Anales de Biologia**, [s.l] v. 15, n. 1-2, p. 63- 76, 1976 .

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, 1993. Cap.1, p.1-3.

DELLA LUCIA, T.M.C.; VILELA, E.F. Métodos atuais de controle e perspectivas. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed). **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1993. Cap.12, p.163-179.

DELLA LUCIA,T.M.C. *Atta bisphaerica*: uma ilustre desconhecida. **Naturalia**, v. 24, p. 53-59, 1999.

DELLA LUCIA, T.M.C.; ARAÚJO, M.S. Formigas cortadeiras: Atualidades no combate. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado** – doenças, pragas e plantas daninhas. Viçosa: UFV / Dep. De Fitopatologia, 2000. p. 245-273.

DELLA LUCIA, T.M.C. Hormigas de importância econômica em La regón Neotropical. In: FERNÁNDEZ, F. (Ed.). **Introducción a lãs hormigas de La región Neotropical**. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 2003. P. 337-349.

DELLA LUCIA, T.M.C.; SOUZA, D.J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo**. Viçosa: UFV, 2011. p. 13-26.

DOW AGROSCIENCES. **Controle de formigas cortadeiras**. s.1, 1998. Folheto.

ELANDT-JOHNSON, R.; JOHNSON, N.L. **Survival models and data analysis**. New York: John Wiley and Sons, 1980.

ETHERIDGE, P.; PHILLIPS, F.T. Laboratory evaluation of new insecticides and bait matrices for the control of leaf-cutting ants (Hymenoptera, Formicidae). **Bulletin Entomological Research**, Cambridge, v. 66, p. 569-78, 1976.

FARJI-BRENER, A.G.; CORLEY, J.C. Successful invasions of hymenopteran insects into NW Patagonia. **Ecologia Austral**, v.8, p.237-249, 1998.

FEBVAY, G.; KERMARREC, A. Digestive Fysiology of leaf-cutting ants. IN: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Eds.) **Fire ants and leaf-cutting ants: Biology and management.** Boulder: Westview Press, 1986. p.274-285.

FORTI, L.C.; DELLA LUCIA, T.M.C.; YASSU, W.K.; BENTO, J.M.; PINHÃO, M.A. Metodologias para experimentos com iscas granuladas para formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed). **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1993. Cap.13, p.191-211.

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

FOWLER, H.; PEREIRA-DA-SILVA, V.; FORTI, L. C.; SAES, N. B. Population dynamics of leaf-cutting ants: a brief rewiew. In: LOFGREN, C. S.; VANDERMEER, R. K. (eds) **Fire ants and leaf-cutting ants**. Boulder: Westiview, 1986, p.123-45.

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

FOWLER, H.; FORTI, L.C.; Di ROMAGNANO, L.F.T. Methods for the evaluation of leaf-cutting ant harvest. In: VANDER MEER, R.K.; JAFFÉ, K.; CEDEÑO, A. **Applied myrmecology**: a world perspective. Boulder: Westview Press, 1990. p.3-14.

FREITAS, S.; BERTI FILHO, E. Efeito do desfolhamento no crescimento de *Eucalyptus grandis* Hill Ex. Maiden (Myrtaceae). **IPEF**, v.47, p.36-43, 1994.

GAMA, V.O sistema salivar de *Camponotus (Myrmothrix) rufipes* (Fabricius, 1775), (Hymenoptera : Formicidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 45, n. 3, p. 317-359, 1985.

GILLOTT, C. **Entomology.** New York: Plenum, 1980, 729 p.

GONÇALVES, C. R. O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hymenoptera: Formicidae). **Stud. Entomol.** Petrópolis, v.4, n.114, p.113-180, 1961.

GONÇALVES, C. R. Nota sobre a sistemática de *Atta sexdens* (L., 1758) e de suas subespécies (Hymenoptera: Formicidade). **Boletim Fitossanitário**, v.9, n. ½, p.1-3, 1963.

GONÇALVES, C. R. As formigas cortadeiras da Amazônia dos gêneros *Atta* Fabr. E *Acromyrmex* Mayr (Hymenoptera: Formicidae). **Atas do Simpósio da Biota Amazônica**, v.5, p.181-202, 1967.

GONÇALVES, C. R. *Atta silvai*, nova espécie de formiga saúva (Hymenoptera, Formicidae). **Arquivo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.5, p.173-78, 1982.

HABES, D.; MORAKCHI, S.; ARIBI, N.; FARINE; J-P.; SOLTANI, N. Boric acid toxicity to the german cockroach, *Blattella germanica*: Alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 1, p. 17-24, 2006.

HERNÁNDEZ, J.V.; JAFFÉ, K. Dano econômico 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, p. 287-298, 1995.
HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. 732p.

IRAC**. Irac Moa Classification Scheme – Version 7.2.** [2012]. Disponível em: <http://www.irac-online.org/teams/mode-of-action>. Acesso em: 06 mai. 2013.

JANET, C. **Anatomie du gaster de la** *Myrmica rubra*. Paris: Georges Carré et C. Naud. Editeurs. 1902. 68p.

JANET, C. **Anatomie de la tête du** *Lasius niger*. Paris: Limoges Impremeire-libraire. Ducourtieux et Gout. 1905. 40p.

JESUS, C.M. **Utilização de alimentos contendo substâncias lipídicas e açucaradas por formigas urbanas.** 2006. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2006.

JUNQUEIRA, L.C.U., JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983. p. 123.

JUSTI Jr., J.; IMENES, S.L.; BERGMANN, E.C.; CAMPOS-FARINHA, A.E.C.; ZORZENON, F.J. Formigas Cortadeiras. **Boletim técnico do Instituto Biológico**, São Paulo, n.4, 1996.

KEMPF, W. W. Catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Entomologica**, n.15, p.3-344, 1972.

LINK, D.; LINK, F.M.; LINK, H.M. Eficácia de sulfluramida – isca granulada, no combate à formiga vermelha de monte, *Acromyrmex heyeri*. **Ciência Florestal**, v.5, n.1, p. 103-111, 1995.

LOECK, A.E.; NAKANO, O. Efeito de novas substâncias visando o controle de sauveiros novos de *Atta laevigata* (Smith, 1858) (Hymenoptera-Formicidae). **Solo**, v. 1, p. 25-30, 1984.

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

MARTINELLI, A. **Histoquímica e ultraestrutura dos túbulos de Malpighi de operárias de** *Atta sexdens rubropilosa* **Forel, 1908 (Hymenoptea: Formicidae)**, 1998. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto e Biociências da Univervidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1998.

MARTINELLI, A; TABOGA, S. R. Estrutura e ultra-estrutura dos túbulos de Malpighi em *Periplaneta americana* (Blattaria). In: XIV COLÓQUIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA, 1., 1993, Caxambu. **Anais**. Caxambu, 1993. p.250-251.

MARTOJA, R.; BALLAN-DUFRANÇAIS, C. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. In: KING, R.C., AKAI, H. **Insect Ultraestruture**. New York: Plenum Press, 1984. v. 2, p. 119-261.

MEHDIABADI, N.J.; SCHULTZ, T.R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecological News**, v. 13, p. 37-55, 2009.

MELLO, M.L.S. A mucous secretion in the Malpighian tubes, of a neotropical bumblebee, *Bombus atratus* Franklin. **Protoplasma**, v. 99, p. 147-158. 1979.

MOHAMED, U.V.K. Histomorphological evidence for ectodermal origin of Malpighian tubules in insects. **Pakistan Journal of Zoology,** v.18, n. 2, p. 171-177, 1986.

MOREIRA, A.A.; FORTI, L.C.; BOARETTO, M.A.; ANDRADE, A.P.P.; ROSSI, M.N. Substrate distribution in fungus chambers in nests of *Atta bisphaerica* Forel, 1908 (Hym., Formicidae). **Journal Applied Entomology**, v. 127, p. 96-98, 2003.

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. Toxicity of sesame seed to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 45, n. 1, p. 195-204, 2005.

MOUTINHO, P. Impactos biogeoquímicos das saúvas sobre o desenvolvimento de florestas na Amazônia. In: ENCONTRO DE MIRMECOLOGIA, 12.; 1995, São Leopoldo. **Anais...** São Leopoldo: Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 1995. p.60-63.

NAGAMOTO, N.S. **Metodologia para seleção de inseticidas visando confecção de iscas tóxicas para formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae)**. 1998. 94 f. Dissertção (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

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

NAGAMOTO, N.S.; FORTI, L.C.; ANDRADE, A.P.P.; BOARETTO, M.A.C.; WILCKEN, C.F. 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.

NAMES. Compendim of pesticide common. **Index of all common names**. Disponível em: <http://www.alanwood.net/pesticides/index_cn_frame.html> Acesso em: 06 mai. 2013.

OLAVARRIETA, A.J.A. **Estudo ultramorfológico e ultra - estrutural dos túbulos de Malpighi de operárias de** *Solenopsis saevissima* **(Hymenoptera : Formicidae),** 2000. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2000.

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

OLIVEIRA, M.A; ARAÚJO, M.S.; MARINHO, C.G.S.; RIBEIRO, M.M.R.; DELLA LUCIA, T.M.C. Manejo de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo**. Viçosa: UFV, 2011. p. 400-419.

PEREGRINE, D.J.; MUDD, A. The effects of diet on the composition of the post-pharyngeal glands of *Acromyrmex octospinosus* (Reich). **Insect Sociaux**, v.21. n. 4, p.417-424, 1974.

PEREIRA, 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.

PHILLIPS, S.A. Jr., VINSON, S.B. Comparative morphology of glands associated with the head among castes of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, **Buren. Ga. Entomol. Soc.**, v. 15, p.215-226, 1980.

PRETTO, D.R.; FORTI, L.C. Dyed baits distribution in nests of *Atta sexdens* L. (Hym., Formicidae). **Journal Applied Entomology**, v. 124, p. 37-39, 2000.

PRIESTER, W. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Calliphora eritrocephala.* **Journal of Ultraestructure Research**, v.36, p.783-805, 1971.

RABELING, C.; COVER, S.P.; JOHNSON, R.A.A.; MUELLER, U.G. A review of the North American species of the fungus-gardening ant genus Trachymyrmex (Hymenoptera: Formicidae). **Zootaxa**, v. 1664, p. 1-53, 2007.

RICHARDS, A.G., RICHARDS, P.A. The peritrofc membrane of insects. **Annual Review of Entomolology**, v. 22, p. 219-240, 1977.

RICHARDS, O.W.; DAVIES, R.G. **IMM' S General Textbook of Entomology**. London: Chapman and Hall, 1977. 135p.

ROSS, H.H. A textbook of entomology. 30 ed. New york: John Wiler, 1965. p. 90-163.

SILVA-ZACARIN, E.C.M. Authophagy and apoptosis coordinate physiological cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Autophagy**, v. 3: p.516-18, 2007.

SMITH, D.S. **Insect cells: their structure and function.** Edinburgh: Oliver and Boyd, 1968. 372p.

SNODGRASS, R.E. Principles of insect morphology. New york: Mc Mac Graw- Hilll Book, 1935. 667p.

SOROKER, V.; VIENNE, C.; HEFETZ, A.; NOWBAHARI, E. The post-pharyngeal gland as a "gestalt" organ for nestmate recognition in ant *Cataglyphis niger*. **Naturwissenschaften**, v. 81, p. 510- 513, 1994.

SOROUR, J. Ultrastructural variations in *Lethocerus niloticum* (Insecta: Hemiptera) caused by pollution in Lake Mariut, Alexandria, Egypt. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, p. 268-274, 2001.

STOCKHOLM CONVENTION. **The new POPs under the Stockholm Convention**. [2009]. Disponível em: <http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>. Acesso em: 14 abr. 2013.

STRINGER, C.E.; LOFGREN, C.S.; BARTELETT, F.J. Imported fire ant toxic bait studies: evaluation of toxicants. **Journal of Economical Entomology**, v.57, n.6, p.941-945, 1964.

STROHM, E.; HERZNER, G.; GOETTLER, W. A "social" gland in a solitary wasp? The postpharyngeal gland of female European beewolves (Hymenoptera, Cabronidae). **Arthropod Structure & Development**, v. 36, p. 113-122, 2007.

STROHM, E. KALTENPOH, M; HERZNER, G. Is th postpharyngeal gland of a solitary digger wasp homologous to ants? **Insects Sociaux**, v.57, p.287-291, 2010.

SUMIDA, S.S. **Análise morfológica dos túbulos de malpighi, do ventrículo e da glândula pós-faríngea das operárias adultas de Atta sexdens rubropilosa Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) tratadas com compostos químicos**. 2007. 53f. Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

SUMIDA, S.S.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; DECIO, P.; MALASPINA, O.; BUENO, F.C.; BUENO, O.C. Toxicological and histopathological effects of boric acid on *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae: Hymenoptera) workers. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 3, p. 676-690, 2010.

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. 174 f. Tese (Doutotado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

TOMOTAKE, M.E.M. **Ultra-estrutura do proventrículo de operárias da subfamília Ponerinae (Hymenoptera : Formicidae),** 1996. 129f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1996.

TSAI, J.H.; PERRIER, J.L. Morphology of digestive and reproductive systems of *Peregrinus maidis* (Homoptera: Delphacidae). **Florida Entomological Society**, v. 76, n. 3, p. 429-436, 1993.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. Grupo de Trabalho Normalização Documentária da UNESP. **Normalização documentária para a produção científica da UNESP:** normas para apresentação de referências segundo a NBR 6023:2002 da ABNT. São Paulo, 2003. Disponível em: <http://www.biblioteca.unesp.br/pages/normalizacao.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2013.

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**, v.78, p.1190-1197, 1985.

VASCONCELOS, H.L.; CHERRETT, J.M. Leaf-cutting ants and early forest regeneration in central Amazonia: effects of herbivory on tree seedling establishment. **Journal of Tropical Ecology**, v. 13, p. 357-370, 1997.

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, 1986. p.399-408.

VINSON, S.B., PHILLIPS, S.A., WILLIANS, H.J. The function of the post- pharyngeal glands of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, Buren. **Journal of Insect Physiology**, v. 20, p. 645- 650, 1980.

WEBER, N. A. **Gardening ants**: the Attines. Philadelphia: the American Philosophical Society, 1972. 146p.

WHEELER, D.E. Nourishment in ants: patterns in individuals and societies. In: HUNT, J.H.; NAPELA, C.A. (Ed.). In: **Nourishment & evolution in insect societies**. Boulder, Colorado: Westview Press, p. 245-278, 1926.

WIGGLESWORTH, V.B. **The principles of insects physiology**. 7ed. London: Chapman and Hall, 1974. 827p.

WILLIAMS, D. F. The development of toxic baits for the red important fire ant. **Florida Entomologist**, v.66, p.162-171, 1983.

WILLIAMS, D.F. Appied Ecology: Overview. In: VANDER MEER, R.K.; JAFFÉ, K.; CEDENO, A. (Eds.). **Applied myrmecology**: a world perspective. Boulder, San Francisco & Oxford: Westiview Press, 1990. p.493-495.

ZANETTI, R.; VILELA, E.F.; ZANUNCIO, J.C.; LEITE, H.G.; FREITAS, G.D. Influência da espécie cultivada e da vegetação nativa circundante na densidade de sauveiros em eucaliptais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 10, p. 1911-1918, 2000.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J.C.; MAYHÉ-NUNES, A.J.; MEDEIROS, A.G.B.; SOUZA-SILVA, A. Combate sistemático de formigas-cortadeiras com iscas granuladas em eucaliptais com cultivo mínimo. **Revista Árvore**, v. 27, n. 3, p. 387-392, 2003.

ZANUNCIO, J.C.; COUTO, L.; SANTOS, G.P.; ZANUNCIO, T.V. Eficiência da isca granulada à base de sulfluramida no controle da formiga cortadeira *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, v.16, n.3, p. 357-361, 1993.