
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA: ZOOLOGIA)

**TOXICIDADE DE EXTRATOS DE *Rauia* sp.
(RUTACEAE) PARA OPERÁRIAS DE *Atta sexdens
rubropilosa* FOREL (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

TAIS GARCIA FREITAS

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno (IBRC-UNESP)

Dissertação apresentada ao instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Zoologia).

RIO CLARO – SP

Agosto 2010

**TOXICIDADE DE EXTRATOS DE *Rauia* sp. (RUTACEAE)
PARA OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* FOREL
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

TAIS GARCIA FREITAS

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno (IBRC-UNESP)

Dissertação apresentada ao instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas (Área de Concentração: Zoologia).

RIO CLARO – SP

Mai 2010

632.9 Freitas, Tais Garcia
F866t Toxicidade de extratos de Rauia sp. (Rutaceae) para
operárias de Atta sexdens rubropilosa Forel (Hymenoptera:
Formicidae) / Tais Garcia Freitas. - Rio Claro : [s.n.], 2010
66 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Odair Correa Bueno

1. Defensivos vegetais. 2. Plantas inseticidas. 3. Controle.
4. Formigas cortadeiras. 5. Produtos naturais. I. Título.

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende." Leonardo da Vinci.

Aos meus pais,
Magno Alberto de Freitas,
Eleusa Alves Garcia de Freitas

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- ◆ À Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho, pela oportunidade de realizar esse trabalho.

- ◆ À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de estudos.

- ◆ Ao meu orientador, Odair Correa Bueno, pela confiança depositada em mim desde o início deste trabalho, pela ajuda, amizade, paciência... pelos elogios, e pelas broncas. Por ser um orientador presente, atencioso, dentro e fora da vida acadêmica.

- ◆ Aos melhores pais do mundo. Minha mãe, Eleusa, exemplo de força, amor, e que sempre me apoia, não importa qual seja a decisão ou situação. Obrigada por existir! Meu pai, Magno, por ser essa pessoa maravilhosa, exemplo de coragem, de caráter, dedicação. Obrigada por estar comigo sempre!

- ◆ Aos companheiros de laboratório, que me ajudaram muito nos experimentos, sem eles esse trabalho não seria concluído. Obrigada Ita, Marcela, Amandinha (Picelli), Nathi (Nathália), Nathi (Nathieli), Papa (Gustavo).

- ◆ Aos companheiros de laboratório, que se tornaram amigos de verdade, e que mesmo não tendo ajudado diretamente nos experimentos, ajudaram deixando meus dias mais alegres, com as conversas, as brincadeiras, as festas, as comilanças... Obrigada, Ita, Marcela, Amandinha, Amandex, Sandrinha, Paixão (Weilan), Catarina, Nathi, Xis (Ana

Paula), Natiele, Margarete, Du, Rodrigo. Vir para o CEIS sem vocês aqui não teria a menor graça.

◆ Aos meus amigos da época de graduação, amigos eternos, que, mesmo longe, deixam minha vida mais colorida, Carol, Joyce, Marina, Thaisona (Thais não teria graça), Rod (Rodrigo também não). Vocês são anjos enviados pra me ajudar a superar os obstáculos que surgem. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

◆ Às companheiras de república, que são minha família “rio clarense”, estando presentes todos os dias, na rotina, nas coisas boas e nas ruins também! Marina, minha parceira, irmãzinha morena e Cibele, companheira pra todas as horas.

◆ Às operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Afinal, sem elas não existiria este trabalho.

◆ À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram na realização dos experimentos, professores, funcionários.

Agradeço a Deus.

SUMÁRIO

	Página
1. RESUMO.....	01
2. INTRODUÇÃO.....	02
3. OBJETIVOS.....	04
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	05
4.1. As formigas cortadeiras.....	05
4.2. Biologia das saúvas.....	05
4.3. Interação com o fungo simbiote.....	07
4.4. Seletividade de plantas por formigas cortadeiras.....	07
4.5. Preparo do substrato para o fungo simbiote.....	08
4.6. Formigas cortadeiras como pragas.....	08
4.7. Métodos de controle.....	09
4.8. Uso de plantas inseticidas, como alternativa de controle.....	11
4.9. <i>Rauia</i> sp. (Rutaceae).....	12
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
5.1. Delineamento experimental.....	14
5.2. Partes vegetais de <i>Rauia</i> sp.	14
5.3. Obtenção dos extratos brutos de folhas e caule de <i>Rauia</i> sp.	14
5.4. Fracionamento dos extratos brutos de <i>Rauia</i> sp.	16
5.4.1. Fracionamento do extrato bruto diclorometânico das folhas.....	16
5.4.2. Particionamento do extrato bruto metanólico das folhas.....	17
5.4.3. Fracionamento do extrato bruto diclorometânico do caule.....	19
5.4.4. Particionamento do extrato bruto metanólico do caule.....	20
5.5. Origem das formigas utilizadas nos bioensaios.....	21
5.6. Dieta artificial para manutenção das operárias.....	22
5.7. Bioensaio por ingestão para determinação da toxicidade.....	22
5.8. Análise estatística.....	23

5.9. Bioensaios de nebulização em colônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> mantidas em laboratório.....	23
5.9.1. Origem e manutenção das colônias.....	23
5.9.2. Bioensaios de nebulização.....	24
5.9.3. Avaliação da nebulização.....	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1. Bioensaio por ingestão.....	28
6.1.1. Extratos brutos de folhas de <i>Rauia</i> sp.	28
6.1.2. Frações do extrato bruto diclorometânico de folhas de <i>Rauia</i> sp.	29
6.1.3. Partições do extrato bruto metanólico de folhas de <i>Rauia</i> sp.	31
6.1.4. Extratos brutos de caule de <i>Rauia</i> sp.	32
6.1.5. Frações do extrato bruto diclorometânico de caule de <i>Rauia</i> sp.	34
6.1.6. Partições do extrato bruto metanólico de caule de <i>Rauia</i> sp.	35
6.2. Testes de nebulização.....	37
6.2.1. Intoxicação das formigas.....	37
6.2.2. Corte de folhas.....	37
6.2.3. Mortalidade de formigas.....	38
6.2.4. Mudança de panela.....	39
6.2.5. Presença de fungo filamentosos.....	39
6.2.6. Redução do jardim de fungo.....	41
6.2.7. Corte de fungo.....	43
7. DISCUSSÃO.....	45
8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	50
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. RESUMO

As formigas estão presentes em quase todos os habitats do planeta. Na maioria das vezes não causam danos ao homem, mas em ambientes modificados, como áreas agrícolas, podem gerar grandes populações e acabar sendo consideradas pragas. As saúvas são chamadas de formigas cortadeiras, pelo hábito que elas têm de cortar as folhas das plantas. Causam danos econômicos justamente pelo desfolhamento que produzem nos vegetais.

Para realizar o controle dessas pragas, muitos produtos químicos são utilizados, mas esse tipo de controle pode gerar efeitos maléficos ao ambiente e à população humana. Atualmente, há uma grande procura por métodos alternativos de controle dessas pragas buscando produtos que apresentem grande especificidade e uma rápida degradação.

Uma alternativa é a utilização de produtos naturais presentes nos vegetais superiores, que podem constituir novas fontes de material com ação tóxica para esses insetos praga. Este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade de *Rauia* sp. para *Atta sexdens rubropilosa*.

Para tal, foram realizados bioensaios por ingestão dos compostos presentes no vegetal. Foram realizados também testes de nebulização, com ninhos incipientes, utilizando os extratos que apresentaram maior potencial tóxico contra as formigas cortadeiras.

Com os resultados dos bioensaios por ingestão, pode-se observar que os compostos presentes no caule e nas folhas de *Rauia* sp. apresentaram toxicidade para *Atta sexdens rubropilosa*. Os extratos brutos diclorometânico e metanólico de ambas as partes vegetais foram fracionadas e testadas novamente por ingestão, e também testados na forma de nebulização.

Das frações obtidas a partir dos extratos diclorometânicos, as de maior polaridade das folhas foram as que apresentaram maior toxicidade, e as de menor polaridade do caule foram as mais tóxicas. Das frações obtidas a partir dos extratos metanólicos, tanto das folhas quanto do caule, as que apresentaram maior toxicidade foram as de menor polaridade.

Os resultados dos testes de nebulização revelaram que os extratos brutos metanólicos, tanto de folhas quanto do caule de *Rauia* sp., possuem um potencial tóxico contra o ninho como um todo, pois apresentam ação deletéria contra toda a colônia.

Com este trabalho pôde-se concluir que os metabólitos secundários presentes em caule e folhas de *Rauia* sp. apresentam toxicidade contra a formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*.

Palavras chave: Formigas cortadeiras, controle, produtos naturais.

2. INTRODUÇÃO

Os insetos pertencem ao grupo de animais com maior diversidade de espécies do mundo, dentre os quais estão as formigas que são importantes na dispersão de sementes e polinização de plantas, na estabilidade do ambiente e do solo (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Entre elas, estão as formigas cortadeiras, conhecidas como saúvas (gênero *Atta*) e quenquéns (gênero *Acromyrmex*), que cortam e transportam folhas e outros pedaços de vegetais frescos para usá-los como substrato para o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* do qual alimentam suas crias e parcialmente os adultos (JAFFE, 1993).

Com as devastações das matas e redução de competidores e inimigos naturais, as formigas cortadeiras encontram condições ideais de proliferação e estabelecimento de novas colônias, se tornando muitas vezes pragas na agricultura dado os efeitos maléficos que causam em monoculturas de larga escala (ANJOS et al., 1998). Isto ocorre tanto pela competição por esses produtos com o homem e seus animais domésticos (AMANTE, 1972), como pela preferência desses insetos para a utilização de plantas exóticas cultivadas (CHERRETT, 1968).

Diversas formas de controle para as formigas cortadeiras têm sido empregadas (DELLA LUCIA; VILELA, 1993), mas a maior parte das metodologias apresenta efeitos temporários e, em alguns casos, danos indesejáveis ao ambiente (WILLIAMS, 1990). Métodos físicos, culturais e biológicos podem ser empregados no controle, contudo o controle químico é o único que apresenta tecnologia disponível para utilização em escala comercial. As estratégias de controle químico diferem principalmente pelo tipo de formulação e modo de aplicação, envolvendo ingredientes ativos de diferentes grupos. Entre as estratégias do controle químico destacam-se as iscas tóxicas (LOECK; NAKANO, 1984) e a termonebulização, que tem ampla utilização nos períodos onde não é possível a utilização de iscas, como o período de chuvas, por exemplo, e quando a paralisação imediata do corte é necessária (FORTI; BOARETTO, 1997).

Atualmente há uma grande necessidade em se buscar novas formas de controle que satisfaçam tanto os interesses econômicos quanto a preservação do meio ambiente, como o uso de produtos de maior especificidade e degradação rápida (MORINI et al., 2005). Uma alternativa que tem apresentado boas perspectivas é a utilização de produtos naturais originários de vegetais potencialmente tóxicos ao fungo e/ou às formigas cortadeiras

(BUENO et al., 1990). Estas substâncias, denominadas metabólitos secundárias, do ponto de vista evolutivo, seriam uma das estratégias utilizadas pelas plantas para se defenderem da herbivoria (ROCKWOOD, 1976).

Várias espécies vegetais já foram estudadas visando o controle de formigas cortadeiras e algumas apresentaram efeitos satisfatórios, demonstrando regressão gradual tanto no número de formigas quanto na esponja do fungo. Tais resultados foram observados nas espécies *Sesamum indicum* (BUENO et al., 1994; MORINI et al., 2005), *Ricinus communis* (HEBLING et al., 1996), *Canavalia ensiformis* (HEBLING et al., 2000), *Cedrela fissilis* (BUENO et al., 2005) e *Cipadessa fruticosa* (LEITE et al., 2005).

Dentro deste contexto, o gênero *Rauia* foi escolhido para a realização de testes de toxicidade com a formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*, pois pertence à família Rutaceae, que possui outros gêneros e espécies que já foram estudados no controle de algumas pragas. Além disso, essa família apresenta uma diversidade muito grande de metabólitos secundários, destacando-se: os alcalóides (MESTER, 1983; WATERMAN, 1975), cumarinas, lignanas, flavonóides, terpenóides e limonóides, que possuem efeitos deterrentes, repelentes e tóxicos para os insetos.

3. OBJETIVO

Diante da importância de se obter novas fontes de substâncias com ação inseticida, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a toxicidade de extratos orgânicos e frações de partes vegetais de *Rauia* sp. (Rutaceae) para a formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae), visando o seu potencial no controle seletivo dessas formigas.

Para tal, foram realizados bioensaios *in vitro* com as operárias isoladas da colônia e testes *in vivo* com a utilização de ninhos incipientes.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. As formigas cortadeiras

Segundo WILSON (1986), as formigas da tribo Attini tiveram uma origem monofilética e o primeiro ancestral surgiu na América do Sul, espalhando-se em direção ao norte, com abrupta diminuição do número de espécies e gêneros.

As formigas cortadeiras, pertencentes à tribo Attini, apresentam ampla distribuição geográfica desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina, abrangendo desde a latitude 40°N à 44°S (WEBER, 1970). Entretanto, o gênero *Atta* inexistente no Chile, em algumas ilhas das Antilhas e no Canadá (MARICONI, 1970).

No Brasil há a subespécie *Atta sexdens rubropilosa*, conhecida como saúva-limão, que é considerada a mais amplamente distribuída e que causa maiores prejuízos à lavoura (GONÇALVES, 1963). O gênero *Atta* ocorre principalmente nos estados de São Paulo, sul de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, sul do Mato Grosso e Paraná (MARICONI, 1976).

4.2. Biologia das saúvas

A população de um saueiro é composta de indivíduos que se diferenciam morfológicamente (polimorfismo) de acordo com as funções que desempenham na colônia (DELLA LUCIA et al., 1993).

As saúvas apresentam castas permanentes e temporárias. A casta temporária é constituída pelos indivíduos férteis que são as fêmeas aladas, denominadas rainhas, içás ou tanajuras, e dos machos alados, conhecidos como bitus. Ambos são produzidos pela colônia em determinadas épocas do ano, vindo à superfície dos ninhos durante a revoada ou vôo nupcial. As fêmeas aladas apresentam cabeça, mandíbulas, tórax e gáster bem desenvolvidos, enquanto que os machos possuem cabeça e mandíbula pouco desenvolvidas, e apresentam um período de sobrevivência curto, morrendo logo após o vôo nupcial (MARICONI, 1970).

A casta permanente é composta pela fêmea fundadora do ninho (rainha), a qual pode viver até 20 anos, e pelas quatro castas de operárias que não possuem função reprodutiva e são encarregadas de diversas tarefas no ninho (DELLA LUCIA et al., 1993). A diferença morfológica entre as operárias se dá principalmente pela largura da cápsula cefálica: as jardineiras, com cápsula cefálica entre 0,8 a 1,0 mm, são responsáveis pelo cuidado com a cria

e no tratamento final e incorporação do material vegetal à esponja do fungo; as generalistas, com cápsula cefálica em torno de 1,5 mm de largura, têm a função de cuidado com o fungo, prole, rainha e descarte do lixo; as forrageadoras, com cápsula cefálica entre 2,0 a 2,2 mm de largura, que recrutam operárias, cortam e coletam vegetação para o ninho e abrem galerias e novas painelas (que são as câmaras dos quais são formados os formigueiros); e os soldados, com cápsula cefálica em torno de 3,0 mm, que têm a função de proteger a colônia (PEREIRA DA SILVA, 1975).

Uma colônia de *Atta* é considerada adulta quando ocorre seu primeiro vôo nupcial. O fenômeno ocorre no Sudeste e Centro Oeste do Brasil durante o período de setembro a dezembro, enquanto que no Sul do Brasil ocorre entre junho e dezembro. A revoada acontece geralmente em dias quentes, úmidos e claros (MARICONI, 1970).

O vôo caracteriza-se pela liberação de grande número de formas aladas que se acasalam no ar. A fêmea é fecundada por 3 a 8 machos, depois desce ao solo e corta suas asas. Após a fecundação o bitu morre e a içá começa a escavar o solo construindo uma câmara inicial a uma profundidade de 8 a 25 cm (FORTI; BOARETTO, 1997).

Antes de saírem para a revoada, as içás carregam uma pequena porção de fungo em sua cavidade infrabucal. Após 48 horas do início da fundação da nova colônia, a rainha deposita o fungo armazenado na câmara inicial e começa a cultivá-lo com suas próprias fezes e secreções. Durante 80 a 100 dias, a rainha coloca ovos grandes (tróficos), os quais servem para sua própria alimentação e da prole inicial, e ovos menores que darão origem às operárias. Antes das primeiras operárias emergirem, cabe a rainha os cuidados gerais com a prole, como alimentação e remoção de um local para outro. Assim que a colônia cresce, as primeiras operárias se desenvolvem e então, tornam-se responsáveis pelo cuidado com o fungo, com as larvas e com a limpeza mútua e da rainha (MARICONI, 1970).

O ciclo de vida de uma operária, de ovo a adulto, é de aproximadamente 55 dias em *Atta sexdens rubropilosa* e os ovos eclodem entre 14 a 22 dias, as pupas são nuas e com apêndices e segmentos claramente definidos. Os ovos colocados pela rainha originarão todos os tamanhos de operárias (FORTI; BOARETTO, 1997).

4.3. Interação com o fungo simbiote

A formiga cortadeira apresenta um mutualismo com o fungo simbiote: a formiga se alimenta do fungo, e este por sua vez, pode se desenvolver no interior do formigueiro, longe de predadores e outros inimigos naturais. A relação mutualística entre o fungo e as formigas cortadeiras é vista como um dos grandes fatores que levam a existência de muitas colônias, com grande sucesso de desenvolvimento nas áreas em que se instalam (SCHADE, 1973; HUBBEL; WIEMER, 1983).

As formigas da tribo Attini cultivam um fungo simbiote denominado *Leucoagaricus gongylophorus*, pertencentes à família Agaricaceae Fr., da divisão Basidiomycota (WARTCHOW, 2005). Apesar de estarem incluídos nesse grupo, esses fungos raramente desenvolvem estruturas sexuais. Alguns autores, como BONONI et al. (1981), sugerem que há emissão de substâncias no formigueiro que impedem a manifestação natural do estágio sexual do fungo, inibindo o desenvolvimento do seu ciclo de vida natural.

4.4. Seletividade de plantas por formigas cortadeiras

Apesar das Attini serem consideradas herbívoros generalistas nos ecossistemas naturais, as formigas cortadeiras não atacam todas as espécies vegetais com a mesma frequência ou intensidade (ROCKWOOD, 1976).

O processo de seleção de plantas pelas formigas pode estar relacionado a uma série de fatores. Um deles é a presença de substâncias que podem ser tóxicas às formigas, ao fungo, ou a ambos (HUBBEL; WIEMER, 1983). Essas substâncias são localizadas, geralmente, na cutícula das folhas e representam uma defesa da planta contra a herbivoria. Outros fatores são as propriedades físicas das plantas como dureza das folhas, pilosidade e produção de látex (STRADLING, 1978), o conteúdo de água e densidade das folhas (WALLER, 1986).

De um modo geral, as espécies nativas são quase imunes ao ataque desses insetos (ROCKWOOD, 1975). Já as espécies de plantas introduzidas e cultivadas são mais susceptíveis ao ataque das formigas cortadeiras (LITTLEDYKE; CHERRETT, 1975).

Normalmente as operárias selecionam material vegetal de diferentes fontes para manter o balanço de nutrientes e umidade adequados ao fungo, sem sobrecarregá-lo com compostos secundários, que podem ser tóxicos à formiga e/ou ao fungo simbiote (HOWARD et al., 1988).

4.5. Preparo do substrato para o fungo simbiote

As formigas cortadeiras desenvolveram um processo complexo para a preparação das partes frescas dos vegetais antes da inoculação do fungo simbiote (WILSON, 1980; ANDRADE et al., 2002).

O processo começa quando as operárias forrageiras coletam e levam fragmentos de folhas para o formigueiro. Tais fragmentos são inspecionados e levados para dentro do ninho. Em seguida, as formigas lambem as superfícies da folha para retirar possíveis microorganismos infectantes e outras impurezas, além de removerem a camada de cera epicuticular da folha (ANDRADE, 1997; DINIZ, 2009). Após a limpeza, as operárias cortam fragmentos em pedaços de 1 a 2 mm, prensam suas bordas, e podem depositar gotas de fluido fecal. Este comportamento é necessário para a deposição de enzimas que auxiliam na degradação inicial de proteínas e polissacarídeos do substrato (QUINLAN; CHERRETT, 1977; DINIZ, 2000; ANDRADE et al., 2002). Finalmente uma operária deposita o pequeno fragmento de folha previamente preparado no fungo e, posteriormente, inocula um pedaço de fungo sobre esse fragmento (DINIZ, 2000, RONHEDE et al., 2004, DINIZ, 2009).

4.6. Formigas cortadeiras como pragas

A introdução de monoculturas agrícolas e florestais causa um desequilíbrio ecológico que fornece condições ideais de proliferação e estabelecimento das colônias de formigas cortadeiras (CHERRETT, 1986).

Altos prejuízos causados por essas formigas devem-se ao fato de que elas atacam muitas espécies vegetais, competindo por esses produtos com o homem e seus animais domésticos (AMANTE, 1972), além do efeito indireto em decorrência da contaminação ambiental pelos agrotóxicos utilizados no seu controle (DELLA LUCIA; FOWLER, 1993).

As formigas cortadeiras são responsáveis por 75% dos custos, e do tempo total gasto no controle de pragas nos reflorestamentos (VILELA, 1986). De acordo com CHERRETT (1986), estas formigas causam danos a diversas culturas como café, cana-de-açúcar, laranja, eucalipto, pinheiro, entre outras. Em culturas de cana-de-açúcar, as saúvas podem ser responsáveis pela perda de 3,6 toneladas do vegetal por ano, o equivalente a perda de 450 Kg de açúcar ou 300 litros de álcool (DOW AGROSCIENCES, 1998).

Além dos prejuízos na área agrícola, tais formigas podem causar danos a prédios, pontes, estradas de rodagem e de ferro, pois os túneis e câmaras das colônias são susceptíveis

ao peso dessas construções. Assim, são inegáveis as perdas ocasionadas por estas formigas (MARICONI, 1970).

4.7. Métodos de controle

Em razão de sua importância econômica, as saúvas têm sido alvo de várias tentativas de controle que incluem desde receitas caseiras, que passam de geração para geração, até recursos de alta tecnologia, que não apresentaram resultados muito significativos (DELLA LUCIA; VILELA, 1993). Atualmente estas formigas podem ser controladas com barreiras mecânicas, métodos culturais, biológicos e químicos.

O controle mecânico de formigas cortadeiras consiste na destruição dos ninhos da área através da escavação do formigueiro, que é efetuada até que a rainha seja localizada e morta. É uma alternativa razoável de controle quando realizado em pequenas áreas sempre que os ninhos estiverem superficiais, dado o esforço demandado (DELLA LUCIA et al., 1993). Na prática, o controle mecânico torna-se inviável em áreas de plantios comerciais, em reflorestamentos e sistemas de pastagens (FORTI; BOARETTO, 1997).

O controle cultural consiste na aração e gradagem da área, dentro do prazo de 4 meses do início do formigueiro. Esse método pode ser importante na eliminação de formigueiros pequenos, o que ocorrerá se a lâmina do arado matar a rainha (DELLA LUCIA et al., 1993). Esse controle basicamente deixou de existir para formigueiros adultos, pois em *Atta*, o efeito pode ser até prejudicial, uma vez que a mecanização do solo pode descaracterizar parcialmente o formigueiro, cessando temporariamente a sua atividade, dando a falsa impressão de que foi controlado e dificultando a sua localização (FORTI; BOARETTO, 1997).

O controle biológico clássico consiste no emprego de predadores, parasitóides e microorganismos (fungos, bactérias e vírus), que utilizam a formiga cortadeira como hospedeiro (FORTI; BOARETTO, 1997). A dificuldade nesse tipo de controle deve-se à vigilância social, base do controle higiênico do ninho das formigas cortadeiras e detecção de microorganismos através das antenas das mesmas (KERMARRECA et al., 1993). Desta forma, o emprego de controle biológico pela introdução de inimigos naturais ainda não pode ser considerado uma estratégia de controle para as formigas cortadeiras, contudo deve ser sempre lembrado como técnica de manejo integrado de pragas (DELLA LUCIA; VILELA, 1993).

Apesar de suas várias restrições, o controle químico é o único que apresenta tecnologia disponível para utilização prática no controle de formigas cortadeiras. Este controle pode ser efetuado por meio de líquidos termonebulizáveis, gases tóxicos, pós secos e iscas granuladas (JUSTI JUNIOR et al., 1996).

A aplicação dos líquidos termonebulizáveis consiste na introdução de um inseticida líquido veiculado em óleo mineral ou diesel sob ação do calor, aplicado nos olheiros (aberturas por onde as formigas entram e saem dos ninhos) por aparelhos próprios, os termonebulizadores, que produzem fumaça tóxica (FORTI; BOARETTO, 1997). Esse método destaca-se como eficiente no controle de grandes ninhos em áreas extensas. No entanto, ele também traz desvantagens operacionais e econômicas, como o custo para aquisição, a manutenção e o transporte do equipamento, a formulação especial do inseticida, a demanda de tempo no tratamento de cada formigueiro e o risco de intoxicação dos operadores (LARANJEIRO; LOUZADA, 2000).

O emprego de gases tóxicos para matar formigas cortadeiras é um dos métodos pioneiros no controle desses insetos. Consiste no uso de gases que são comercializados comprimidos em embalagens apropriadas e são liberados diretamente no interior dos ninhos, através dos olheiros por meio de mangueiras adaptadas ou uma válvula de saída. Tal método dispensa o uso de equipamentos na aplicação, no entanto o custo da formulação dos ingredientes ativos utilizados é elevado e envolve muita mão-de-obra (JUSTI JUNIOR et al., 1996).

Os formicidas em pó são formulados em veículos sólidos, para serem aplicados com equipamentos manuais denominados polvilhadeiras. A morte das formigas ocorre pelo contato direto com o produto, que é aplicado nos olheiros visando atingir o interior do formigueiro. Esse tipo de utilização tem como limitação a impossibilidade de penetração do produto em todas as câmaras de ninhos adultos de *Atta*, devido a sua complexidade estrutural e aderência do produto ao solo devido à umidade (FORTI; BOARETTO, 1997).

As iscas tóxicas são constituídas da mistura de um substrato atrativo com um princípio ativo tóxico, na forma de grânulos, os quais são distribuídos nas trilhas, próximas às colônias, e transportadas para o interior pelas formigas. O inseticida deve agir por ingestão e apresentar ação tóxica retardada, deve ser letal em baixas concentrações, ser inodoro, não deve ser repelente e não causar danos ambientais (FORTI; BOARETTO, 1997).

4.8. Uso de plantas inseticidas, como alternativa de controle

Os inseticidas sintéticos têm a vantagem de promover ganhos na produção agrícola, porém, a aplicação repetida provoca poluição ambiental (VIEGAS JUNIOR, 2003), intoxicação de trabalhadores no campo (ALMEIDA; PUGA, 1979), toxicidade para insetos não alvo, resistência e ressurgimento de pragas (CHIU, 1989). Por essas implicações, há uma intensificação na busca de substâncias mais seguras. BUENO et al. (1990) têm encontrado boas perspectivas na utilização de produtos originários de plantas potencialmente tóxicas ao fungo e/ou às formigas cortadeiras.

A toxicidade de uma substância química aos insetos não a qualifica necessariamente como um inseticida. Algumas propriedades devem estar associadas à atividade, tais como a eficácia em baixas concentrações, a ausência de toxicidade para animais superiores como mamíferos e vegetais, a fácil obtenção, manipulação e aplicação, a viabilidade econômica e o fato de não ser acumulativa no tecido adiposo humano e de animais domésticos (VIEGAS JUNIOR, 2003).

A maior parte dos produtos naturais presentes nos vegetais superiores são metabólitos secundários e tem sido identificada como tóxica por serem inibidores de crescimento e de reprodução, repelentes e deterrentes para os insetos (TAVERNER et al., 2001).

A *Azadirachta indica* (Meliaceae), o nim, é considerada atualmente a planta com propriedade inseticida mais importante, pois ela apresenta uma série de compostos químicos presentes na semente, com atividade inseticida, principalmente a azadiractina (VENDRAMIM, 2000). Tais compostos inibem o crescimento e reprodução, além de agirem como deterrentes e repelentes na maioria dos insetos (REMBOLD, 1987; JACOBSON, 1989; SAXENA, 1989). Estudos mostraram que o óleo bruto da semente de *Azadirachta indica* causa alta mortalidade, com redução significativa em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* quando adicionado à dieta das formigas e também pela aplicação tópica de seus extratos orgânicos. (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2006).

MULLENAX (1979) forneceu folhas de *Canavalia ensiformis*, conhecida como fava-branca, para o formigueiro de *Atta* e observou uma diminuição na atividade do ninho, sugerindo ser conseqüência de substâncias com atividade fungicida. Os efeitos tóxicos observados podem ser atribuídos a um aminoácido denominado canavanina (STRADLING; POWELL, 1992).

Uma linha de pesquisa vem sendo desenvolvida no Cento de Estudos de Insetos Sociais, em parceria com pesquisadores do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal

de São Carlos, na procura de novas espécies vegetais, e seus metabólitos secundários, que sejam tóxicos para *Atta sexdens rubropilosa*. O presente trabalho teve a colaboração da aluna de pós-graduação em química da UFSCar Tatiani Mesquita Bondancia, sob orientação do Prof. Dr. João Batista Fernandes, e de dois outros pesquisadores, a Prof^a. Dr^a. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva e o Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira.

Várias espécies já apresentaram efeitos satisfatórios, como as folhas de *Sesamum indicum*, o gergelim, que apresentam toxicidade às formigas (HEBLING-BERALDO et al., 1984; BUENO et al., 1995, 2004a,b; MORINI et al., 2005). Esse efeito foi observado por BUENO et al. (1995), pois as folhas desse vegetal reduziram gradualmente tanto o número de formigas quanto a esponja de fungo, além de provocar mudanças de comportamento das operárias, na umidade das câmaras e no aspecto geral do lixo acumulado nos formigueiros de *Atta sexdens rubropilosa* tratados no laboratório.

Efeitos tóxicos também foram observados em espécies como *Ricinus communis* (HEBLING et al., 1996; BIGI et al., 2004), *Canavalia ensiformis* (HEBLING et al., 2000a), *Ipomoea batatas* (HEBLING et al., 2000b), *Cedrela fissilis* (BUENO et al., 2005), *Cipadessa fruticosa* (LEITE et al., 2005) e *Carapa guianensis* (AMBROZIN et al., 2006).

4.9. *Rauia* sp. (Rutaceae)

O gênero *Rauia* pertence à família Rutaceae, e à ordem Rutales que é constituída por 3000 a 3500 espécies distribuídas em 6 famílias: Rutaceae, Meliaceae, Ptaeroxylaceae, Simaroubaceae, Cneoraceae e Burseraceae. Nesse grupo de famílias é encontrada uma rica e diversificada gama de metabólitos secundários. Os metabólitos de maior ocorrência são as cumarinas, alguns grupos de alcalóides (acridonas, carbasóis, hemiterpenos e quinolinas), flavonóides, quassinóides (VELOSO, 1995 apud WATERMAN, 1975).

Com base nesta riqueza e diversidade, a ordem Rutales tornou-se alvo de um considerável número de pesquisadores interessados na biogênese, no isolamento e na identificação de novos compostos.

A família Rutaceae possui uma grande diversidade de metabólitos secundários. Dentre eles podem-se destacar os alcalóides, especialmente os derivados do ácido antranílico, terpenóides, flavonóides, cumarinas, lignanas e os limonóides (VELOSO, 1997 apud WATERMAN, 1975).

Muitos desses metabólitos possuem variadas atividades biológicas, de grande importância farmacológica (WATERMAN; GRUNDON, 1983), despertando o interesse cada

vez maior na investigação fitoquímica dessa família. Inúmeros trabalhos sobre atividades antifúngicas, bactericidas, antivirais e inseticidas de alcalóides, cumarinas e limonóides de plantas desta família têm sido publicados. Vários produtos naturais têm sido purificados e identificados da família Rutaceae de espécies brasileiras, sendo alguns deles com atividade anticancerígena, antimicrobiana e fungicida (ativas contra o fungo de formigas cortadeiras) indicando que novos estudos utilizando plantas dessa família devem ser realizados.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Delineamento experimental

Inicialmente, foram realizados bioensaios de toxicidade *in vitro* por ingestão dos compostos de partes vegetais de *Rauia* sp., utilizando-se operárias médias de *Atta sexdens rubropilosa*. Após a obtenção dos primeiros resultados, os extratos brutos que apresentaram maior toxicidade às formigas foram aplicados em colônias pequenas (1 L de jardim de fungo) mantidas em formigueiros artificiais em laboratório, pela técnica de nebulização, de acordo com a metodologia utilizada em experimentos anteriores (SANTOS-OLIVEIRA, 2006). Não foram realizados testes de nebulização com as frações de maior toxicidade por não haver quantidade suficiente, já que foram necessários 1,6 g de material para a mistura a ser nebulizada, e a maioria das frações obtidas não atingiu essa massa.

5.2. Partes vegetais de *Rauia* sp.

A espécie *Rauia* sp. foi coletada no município Aureliano Leal, Bahia, pela Dra. Jacquelyn Kallunki e pelo Dr. José Rubens Pirani. A amostra utilizada no presente trabalho foi a de número 415. Foram separadas as folhas e caule da planta.

A Dra. Jacquelyn Kallunki está realizando a revisão taxonômica do gênero *Rauia* na qual descreverá espécies ainda inéditas que inclui a espécie em estudo.

5.3. Obtenção dos extratos brutos de folhas e caule de *Rauia* sp.

Os extratos brutos foram preparados anteriormente no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, pela técnica Dorai Periotto Zandonai. As partes vegetais (folhas e caule) da espécie de *Rauia* sp. foram secas em estufa de circulação a 40°C durante aproximadamente dez dias e posteriormente trituradas em moinho. O material seco e moído foi submetido a três extrações consecutivas com um intervalo de três dias entre cada uma delas utilizando-se os solventes hexano (EH), diclorometano (ED), metanol (EM), nessa ordem de polaridade (Figura 1). Esse procedimento foi o mesmo para folhas e caule.

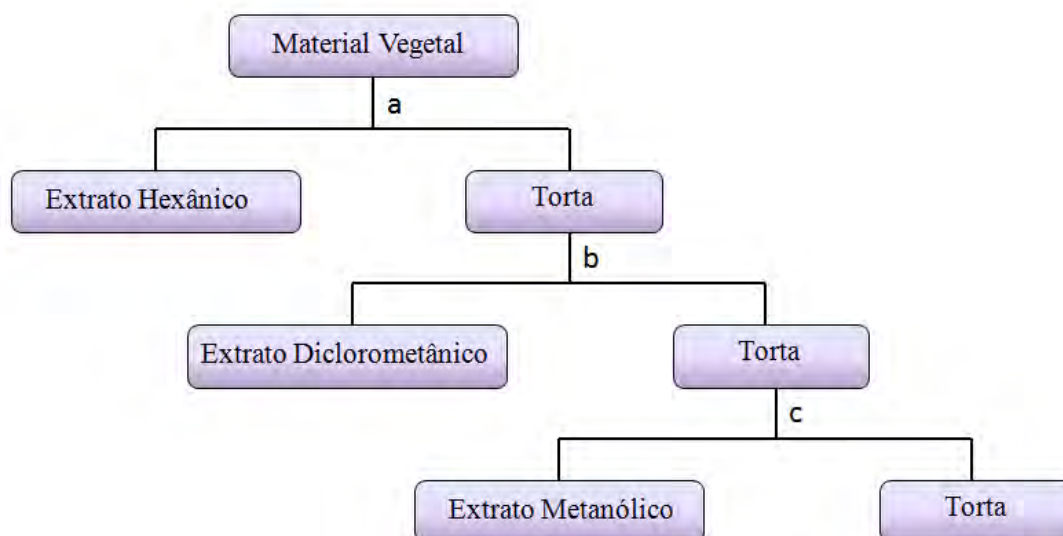


Figura 1. Preparação dos extratos brutos de folhas e caule de *Rauia* sp.

- a) Maceração com Hexano por cinco dias por três vezes.
 b) Maceração com Diclorometano por cinco dias por três vezes.
 c) Maceração com Metanol por cinco dias por três vezes.

Os extratos foram concentrados em rotaevaporadores. As partes vegetais utilizadas no preparo dos extratos, assim como as massas obtidas, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Massas de material vegetal e de extratos brutos obtidos.

<i>Rauia</i> sp.		Massas de Extratos Obtidos (g)		
Material Vegetal	Massa Vegetal (g)	E. H.	E.D.	E.M.
Folhas	1324	7,02	16,26	24,92
Caule	4986	5,61	14,22	242,79

E = Extrato; H = Hexânico; D = Diclorometânico; M = Metanólico.

5.4. Fracionamento dos extratos brutos de *Rauia* sp.

5.4.1. Fracionamento do extrato bruto diclorometânico das folhas

O extrato bruto diclorometânico das folhas de *Rauia* sp. apresentou um potencial tóxico para as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Por isso, 10 g desse extrato foram fracionados por cromatografia a vácuo utilizando-se sílica gel 70-230 Mesh como fase estacionária e como fase móvel uma mistura de solventes em ordem crescente de polaridade como demonstrado resumidamente na Figura 2 obtendo-se oito frações. As frações obtidas e suas respectivas massas estão representadas na Tabela 2.

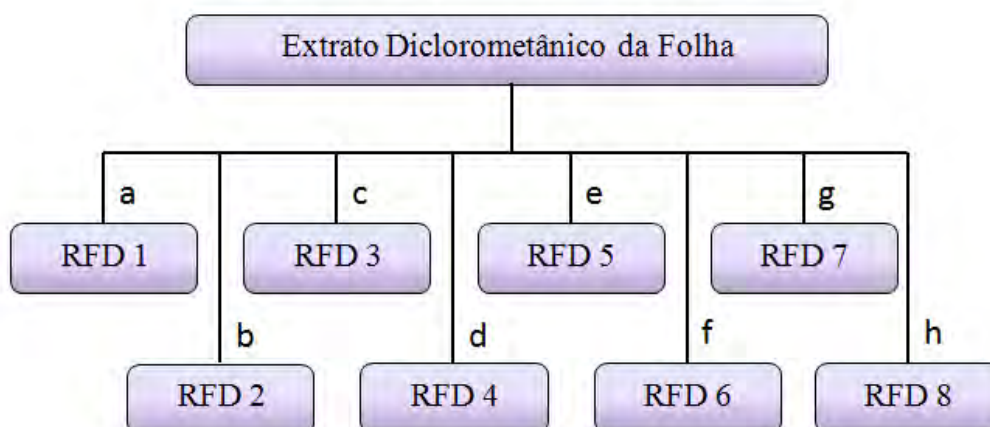


Figura 2. Fracionamento do extrato bruto diclorometânico de folha de *Rauia* sp.

- | | |
|--|-------------------------------------|
| a) Hexano 100% | e) Acetato de Etila : Acetona 5 : 5 |
| b) Hexano : Acetato de Etila 7,5 : 2,5 | f) Acetona 100% |
| c) Hexano : Acetato de Etila 5 : 5 | g) Acetona : Metanol 5 : 5 |
| d) Acetato de Etila 100% | h) Metanol 100% |

RFD = *Rauia* sp. folha fração diclorometânica.

Tabela 2. Frações obtidas do extrato bruto diclorometânico de folha de *Rauia* sp.

Fração	Massa (g)
RFD 1	0,228
RFD 2	0,706
RFD 3	0,173
RFD 4	2,272
RFD 5	2,588
RFD 6	0,908
RFD 7	2,732
RFD 8	0,393

5.4.2. Particionamento do extrato bruto metanólico das folhas

O extrato bruto metanólico das folhas de *Rauia* sp. apresentou potencial tóxico para as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Então, 8 g desse extrato foram submetidos à partição líquido-líquido (Figura 3) originando três frações. As frações obtidas e suas respectivas massas estão representadas na Tabela 3.

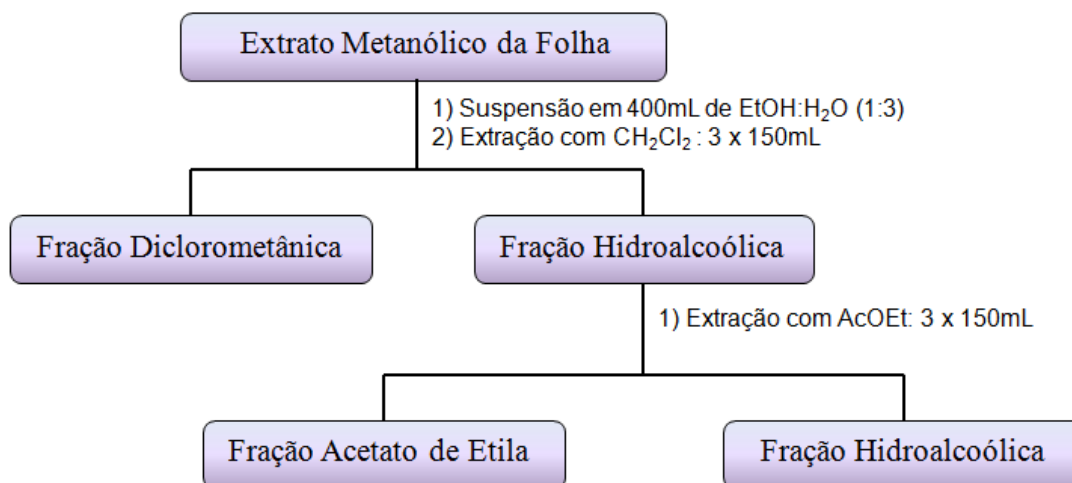


Figura 3. Partição do extrato bruto metanólico de folha de *Rauia* sp.

As partições resultantes foram concentradas sob vácuo em evaporador rotativo e a completa secagem do material vegetal foi obtida através do seu armazenamento em vidros sob capela de exaustão de gases, à temperatura ambiente.

Tabela 3. Frações obtidas do extrato bruto metanólico de folha de *Rauia* sp.

Fração	Massa da Fração (g)
Fração Diclorometânica (PFD)	0,9
Fração Acetato de Etila (PFA)	1,3
Fração Hidroalcoólica (PFH)	5,8

5.4.3. Fracionamento do extrato bruto diclorometânico do caule

O extrato bruto diclorometânico do caule de *Rauia* sp. apresentou potencial tóxico para as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Diante disso, 2,5 g desse extrato foram fracionados por cromatografia a vácuo utilizando-se como fase estacionária sílica gel 70-230 Mesh com eluição gradiente em ordem crescente de polaridade (Figura 4) originando nove frações.

Foram realizados testes de toxicidade com as formigas somente com as frações de 4 a 9. As frações de 1 a 3 não foram testadas por não haver massa suficiente para a preparação de dietas artificiais para alimentação das operárias nos bioensaios.

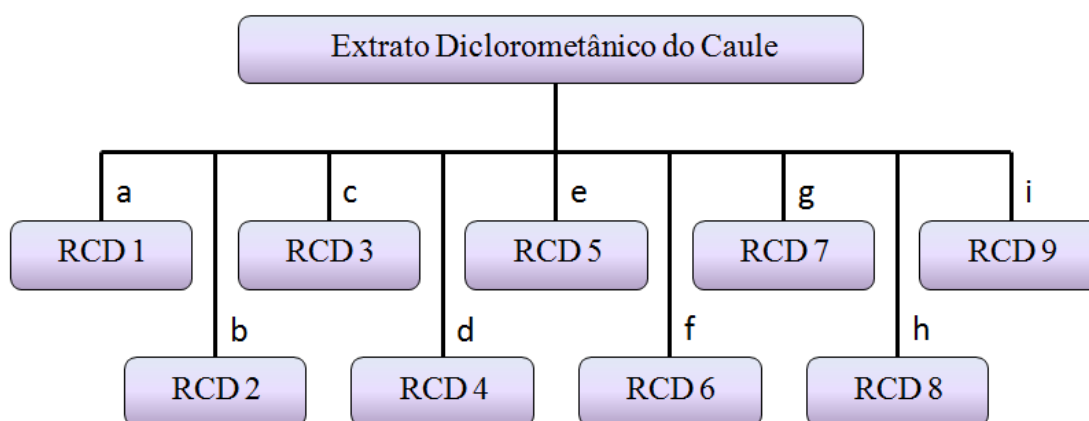


Figura 4. Fracionamento do extrato bruto diclorometânico de caule de *Rauia* sp.

- | | |
|--|--|
| a) Hexano 100% | f) Acetato de Etila : Acetona 5 : 5 |
| b) Hexano : Acetato de Etila 7,5 : 2,5 | g) Acetona 100 % |
| c) Hexano : Acetato de Etila 5 : 5 | h) Acetona : Metanol 5 : 5 |
| d) Acetato de Etila 100 % | i) Metanol 100 % |
| e) Acetato de Etila : Acetona 7,5 : 2,5 | |

RCD = *Rauia* sp. caule fração diclorometânica.

As frações obtidas e suas respectivas massas estão representadas na Tabela 4.

Tabela 4. Frações obtidas do extrato bruto diclorometânico de caule de *Rauia* sp.

Fração	Massa (g)
RCD 1	0,007
RCD 2	0,023
RCD 3	0,025
RCD 4	0,556
RCD 5	0,209
RCD 6	0,324
RCD 7	0,247
RCD 8	0,858
RCD 9	0,246

5.4.4. Particionamento do extrato bruto metanólico do caule

O extrato bruto metanólico do caule de *Rauia* sp. apresentou atividade tóxica para as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Então 17,4 g desse extrato foram submetidos a uma partição líquido-líquido (Figura 5) originando três partições.

Os extratos foram concentrados em rotaevaporadores. A quantidade obtida de cada partição está descrita na Tabela 5.

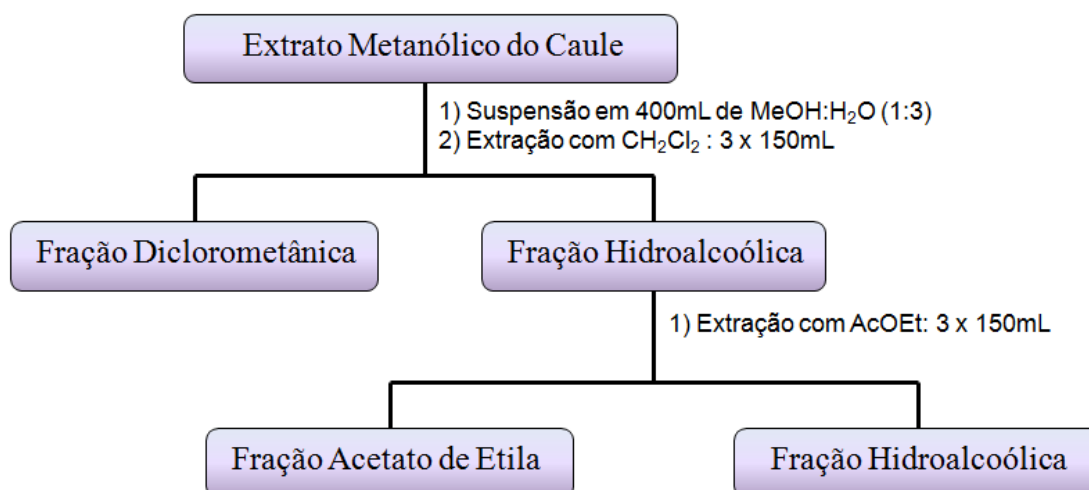


Figura 5. Partição do extrato bruto metanólico de caule de *Rauia* sp.

Tabela 5. Frações obtidas do extrato bruto metanólico de caule de *Rauia* sp.

Fração	Massa da Fração (g)
Fração Diclorometânica (PCD)	2,068
Fração Acetato de Etila (PCA)	2,158
Fração Hidroalcoólica (PCH)	13,174

5.5. Origem das formigas utilizadas nos bioensaios

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram coletadas operárias de *Atta sexdens rubropilosa* com massa corpórea variando de 15 a 25 mg e largura da cápsula cefálica entre 2,0 e 2,8 mm, que são as forrageadoras. As formigas foram obtidas de um ninho adulto, mantido em sala climatizada com temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. acima de 70% no Laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

Os formigueiros mantidos em laboratório foram tratados basicamente com folhas de eucalipto e aveia em flocos e ocasionalmente bagaço de laranja, flores de *Hibiscus* sp. e quirera de milho.

5.6. Dieta artificial para manutenção das operárias

Para manutenção das formigas isoladas do formigueiro, e conseqüentemente na ausência do fungo simbiote, foram preparadas dietas sólidas, cada uma contendo 5 g de glicose, 1 g de peptona bacteriológica, 0,1 g de extrato de levedura e 1,5 g de agar bacteriológico, dissolvidos em 100 mL de água destilada (BUENO et al., 1997). Após a mistura das substâncias, as dietas foram levadas ao forno micro-ondas para melhor solubilização e homogeneização. Depois, foram autoclavadas a 120°C e 1 atm por 15 minutos. Em uma capela as dietas ainda líquidas foram vertidas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro previamente esterilizadas na autoclave e, após o resfriamento das dietas, as placas foram envolvidas com filme PVC e mantidas na geladeira para melhor conservação durante o período dos bioensaios.

5.7. Bioensaio por ingestão para determinação da toxicidade

Com o auxílio de uma pinça entomológica realizou-se a coleta das formigas do ninho, sendo estas depositadas em uma bandeja de plástico com as bordas revestidas com Teflon-30, para evitar fugas. No interior da bandeja foi colocado um chumaço de algodão embebido em água, para manter a umidade ideal às formigas.

Para cada um dos tratamentos foram separadas 5 placas de Petri com 10 cm de diâmetro, previamente esterilizadas e forradas com papel filtro, contendo 10 formigas em cada uma delas. Essas placas foram mantidas em estufa para B.O.D. com temperatura média de 24[±]1°C e umidade relativa acima de 70%. A cada 24 horas as dietas foram renovadas e, sempre que necessário, os papéis filtro foram trocados, a fim de se evitar o desenvolvimento de microorganismos contaminantes bem como manter o ambiente limpo para as formigas. Diariamente foram efetuadas as retiradas e anotações das formigas mortas. As dietas foram colocadas em pedaços de papel alumínio na quantidade aproximada de 0,5 g/placa.

Foi estipulado um período máximo de 25 dias para a realização dos experimentos de toxicidade levando em consideração o período normal de sobrevivência das formigas mantidas com dieta artificial isoladas do formigueiro (BUENO et al., 1997).

Tanto os extratos quanto as frações de *Rauia* sp. foram incorporados na dieta utilizando o método dry-mix, que consiste em acrescentar o princípio ativo à glicose e aos demais ingredientes secos da dieta e, posteriormente, à água destilada. Neste caso, não é utilizado solvente. Os extratos e frações foram incorporados na concentração de 2,0 mg/mL.

Durante o período do bioensaio foi utilizado um controle que constituiu no oferecimento de apenas dieta artificial com o intuito de verificar a interferência do manuseio na sobrevivência das formigas.

5.8. Análise estatística

Os dados do bioensaio por ingestão foram avaliados através da elaboração das curvas de sobrevivência, a partir da porcentagem de formigas vivas por dia, no conjunto das 5 placas. A comparação entre as curvas de sobrevivência das operárias do grupo controle com aquelas dos tratamentos foi realizada com o emprego do teste “long-rank” (HARVEY MOTULSKY, 1995), utilizando-se o software Graph-Pad Prism (versão 3.0).

5.9. Bioensaios de nebulização em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório

5.9.1. Origem e manutenção das colônias

As colônias de *Atta sexdens rubropilosa* utilizadas nesses bioensaios foram coletadas na Fazenda Corumbataí, Corumbataí, SP (22° 17' S, 47° 39' W) em março de 2009. Cada colônia foi colocada em um recipiente de plástico transparente de 1000 mL contendo uma camada de gesso no fundo para manter a umidade do jardim de fungo. Posteriormente, outras duas câmaras de plástico, de 500 mL cada, foram interligadas ao primeiro por tubos plásticos transparentes, sendo uma para o descarte do lixo produzido pela colônia, e a outra para o fornecimento de alimento (Figura 6).

As colônias foram mantidas em laboratório em sala climatizada em uma temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa acima de 70%. Foram oferecidos diariamente folhas

de eucalipto e flocos de aveia até que o jardim de fungo atingisse o volume de 1000 mL, ideal para a realização dos bioensaios.

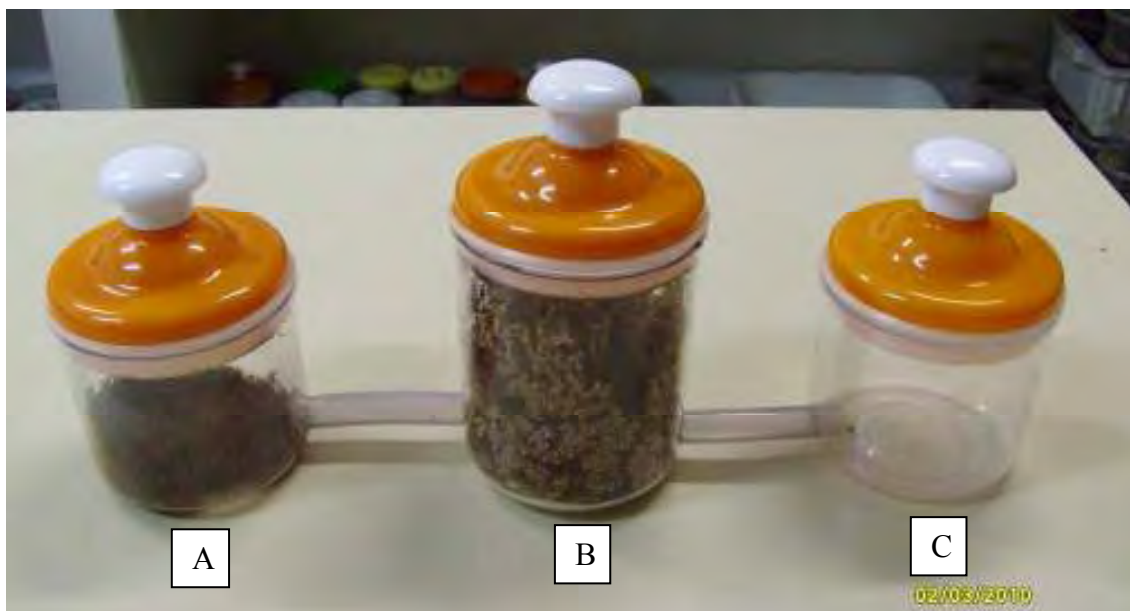


Figura 6. Vista geral de um ninho artificial de *Atta sexdens rubropilosa* mantido em laboratório. **A:** câmara de lixo, **B:** câmara de fungo, **C:** câmara de alimentação.

5.9.2. Bioensaios de nebulização

Para a realização dos bioensaios de nebulização foi utilizado um equipamento composto de um compressor portátil, acoplado a um nebulizador pequeno que é utilizado para inalação (Figura 7). A panela de alimentação foi removida do ninho e o equipamento foi acoplado no lugar desta, para aplicação da nebulização.

Foram selecionadas 12 colônias incipientes de *Atta sexdens rubropilosa* com 1000 mL de jardim de fungo, distribuídas em três colônias para cada um dos tratamentos testados, além do grupo testemunha que não recebeu nenhum extrato de *Rauia* sp.

Em trabalhos anteriores, foi feita uma padronização de um veículo que é misturado aos extratos para a formação da fumaça pelo aparelho. A substância escolhida foi o óleo de soja, por não causar mortalidade das formigas e por ser facilmente encontrado (SANTOS-

OLIVEIRA, 2006). Para a homogeneização dos componentes foi utilizado um emulsificante, o detergente Renex.

O grupo controle recebeu somente óleo de soja com o detergente. Os tratamentos foram nebulizados com uma mistura de 10% de extrato com 90% de óleo de soja, com o emulsificante, de acordo com uma metodologia já utilizada em trabalhos anteriores para tratamento por nebulização em ninhos de formigas cortadeiras (KENNARD, 1965).

Os tratamentos foram compostos por três ninhos cada, que receberam os seguintes extratos brutos: diclorometânico e metanólico de caule e folhas de *Rauia* sp., pois esses foram os extratos que apresentaram um maior potencial tóxico nos bioensaios por ingestão.

No dia anterior à realização dos testes, todos os restos de folhas não cortadas e lixo foram retirados das panelas de alimentação e de lixo respectivamente. As colônias ficaram sem receber nenhum tipo de alimento por 24 horas. Isto foi feito para que o corte das folhas que seriam oferecidas às formigas após a nebulização fosse estimulado. Os ingredientes (óleo de soja, extrato bruto e detergente) foram homogeneizados manualmente, de modo a formar uma calda e, posteriormente, foram colocados no recipiente plástico (unidade nebulizadora) que foi acoplado ao ninho e ao equipamento de nebulização (Figura 8). Cada colônia recebeu, então, 5 mL dessa mistura (LOECK et al., 2001). A nebulização durou aproximadamente de 15 a 20 minutos em cada colônia.

Tratamentos realizados:

a-) **Grupo controle:** 100% de óleo de soja.

b-) **Tratamento 1:** extrato bruto diclorometânico de folha de *Raiua* sp. (10%) e 90% de óleo de soja

c-) **Tratamento 2:** extrato bruto metanólico de folha de *Rauia* sp. (10%) e 90% de óleo de soja.

d-) **Tratamento 3:** extrato bruto diclorometânico de caule de *Rauia* sp. (10%) e 90% de óleo de soja.

e-) **Tratamento 4:** extrato bruto metanólico de caule de *Rauia* sp. (10%) e 90% de óleo de soja.



Figura 7. Equipamento desenvolvido para nebulização em ninhos artificiais. **A:** compressor portátil, **B:** Regulador da vazão.



Figura 8. Unidade nebulizadora (seta) acoplada ao ninho incipiente de *Atta sexdens rubropilosa*.

5.9.3. Avaliação da nebulização

Após 24 horas da aplicação da nebulização, todas as colônias voltaram a receber o suprimento usual de folhas e durante 21 dias foram realizadas avaliações diárias de alguns aspectos das colônias, baseadas nas observações de: intoxicação de formigas, corte de folhas, mortalidade de formigas, mudança de panela, presença de fungo filamentososo, redução no jardim de fungo, presença de pedaços de fungo no lixo (corte de fungo).

Para os itens avaliados utilizou-se as seguintes escalas de quantificação:

- ◆ Intoxicação de formigas: **0** – sem sintomas de intoxicação; **1** – 25% das formigas com sintomas; **2** – 50% das formigas com sintomas; **3** – 75% das formigas com sintomas; **4** – 100% das formigas com sintomas. Os sintomas de intoxicação esperados foram: tremores, dificuldade de locomoção, paralisia das pernas.
- ◆ 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 das formigas: **0** – sem mortalidade; **1** – 25% das formigas mortas; **2** – 50% das formigas mortas; **3** – 75% das formigas mortas; **4** – 100% das formigas mortas.
- ◆ Colônias com mudança de panela: **0** – sem mudança de panela; **1** – com mudança de panela. A mudança de panela pode indicar que as formigas perceberam alguma ameaça, como alguma substância tóxica (fumaça) e por isso têm esse comportamento de levar o fungo e as crias para outro lugar mais seguro.
- ◆ Presença de fungo filamentososo: **0** – sem ocorrência de contaminação; **1** – com ocorrência de contaminação.
- ◆ Colônia com redução do jardim de fungo: **0** – sem redução; **1** – com redução.
- ◆ Corte de fungo: **0** – sem corte de fungo; **1** – 25% do fungo cortado; **2** – 50% do fungo cortado; **3** – 75% do fungo cortado; **4** – 100% do fungo cortado.

A análise gráfica de cada um dos itens observados foi feita através dos valores acumulados das três repetições (colônias).

6. RESULTADOS

6.1. Bioensaio por ingestão

6.1.1 Extratos brutos de folhas de *Rauia* sp.

Os resultados obtidos nos bioensaios por ingestão dos extratos brutos de folhas de *Rauia* sp., na concentração 2,0 mg/mL, estão representados através da Figura 9 que contém as curvas de sobrevivência e da Tabela 6, que contém as porcentagens acumuladas de mortalidade diária, o respectivo valor mediano (Md), que indica o dia de experimento em que metade das formigas estava morta, e a interpretação do teste “log-rank”.

Neste experimento, a mortalidade das operárias acumulada (%) por dia aumentou gradativamente durante o decorrer do bioensaio, sendo que atingiu 100% das formigas mortas com os extratos obtidos com os solventes diclorometânico e metanólico, até o término do experimento. Metade das operárias já estava morta no 4º dia do bioensaio tanto para os tratamentos com os extratos diclorometânico e metanólico, e no 9º dia do bioensaio para o tratamento com o extrato hexânico. Como os dois primeiros extratos apresentaram uma maior toxicidade para *Atta sexdens rubropilosa*, eles foram fracionados para realização de novos bioensaios por ingestão. Todos os tratamentos tiveram uma diferença significativa dos valores do controle, de acordo com a interpretação do teste “log-rank”.

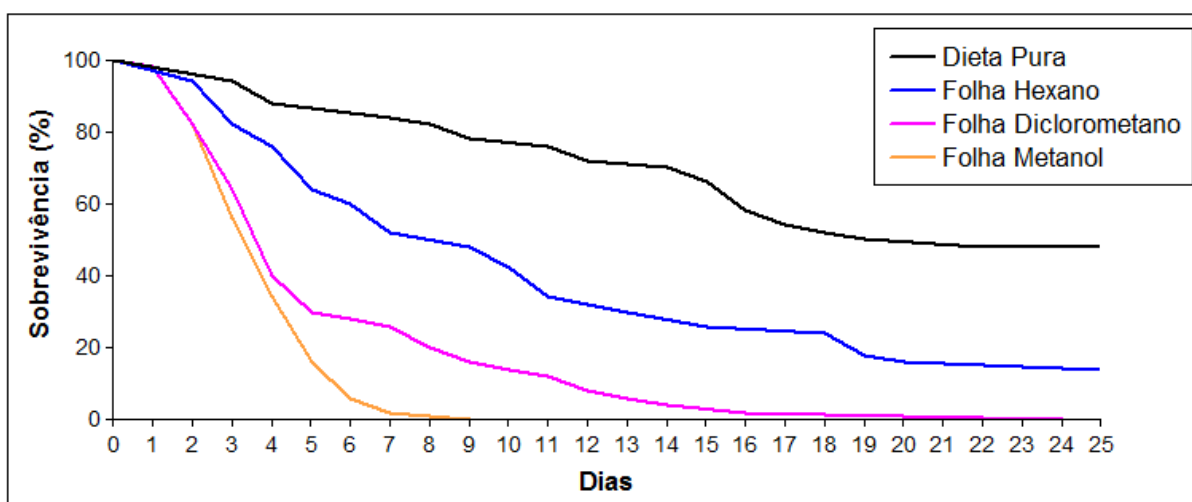


Figura 9. Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de extratos brutos de folhas de *Rauia* sp. na concentração 2,0 mg/mL.

Tabela 6. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de extratos brutos de folhas de *Rauia* sp. na concentração 2,0 mg/mL.

Extrato	Mortalidade acumulada (%) por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	0	6	12	18	22	30	46	50	64	19 _a
Hexânico	0	6	18	40	48	58	70	74	84	86	9 _b
Diclorometânico	2	18	36	72	80	86	96	98	98	100	4 _b
Metanólico	2	18	44	94	98	100	100	100	100	100	4 _b

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

6.1.2. Frações do extrato bruto diclorometânico de folhas de *Rauia* sp.

Na Figura 10 e na Tabela 7 constam os resultados obtidos nos bioensaios por ingestão das frações obtidas a partir do extrato bruto diclorometânico das folhas de *Rauia* sp., também na concentração de 2,0 mg/mL. Os resultados consistem nas curvas de sobrevivência, nas porcentagens acumuladas de mortalidade diária, nos respectivos valores medianos (Md) e também na interpretação do teste “log-rank”.

A mortalidade acumulada (%) por dia teve um aumento gradativo durante o tempo de experimento. Todas as frações testadas apresentaram uma diferença significativa em relação ao controle com dieta pura. Porém, não houve mortalidade de 100% em nenhuma delas.

Pode-se observar que as frações de maior polaridade, RFD 6, RFD 7 e RFD 8, foram as que apresentaram uma maior toxicidade para as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, atingindo uma mortalidade acima ou igual a 90% de formigas mortas.

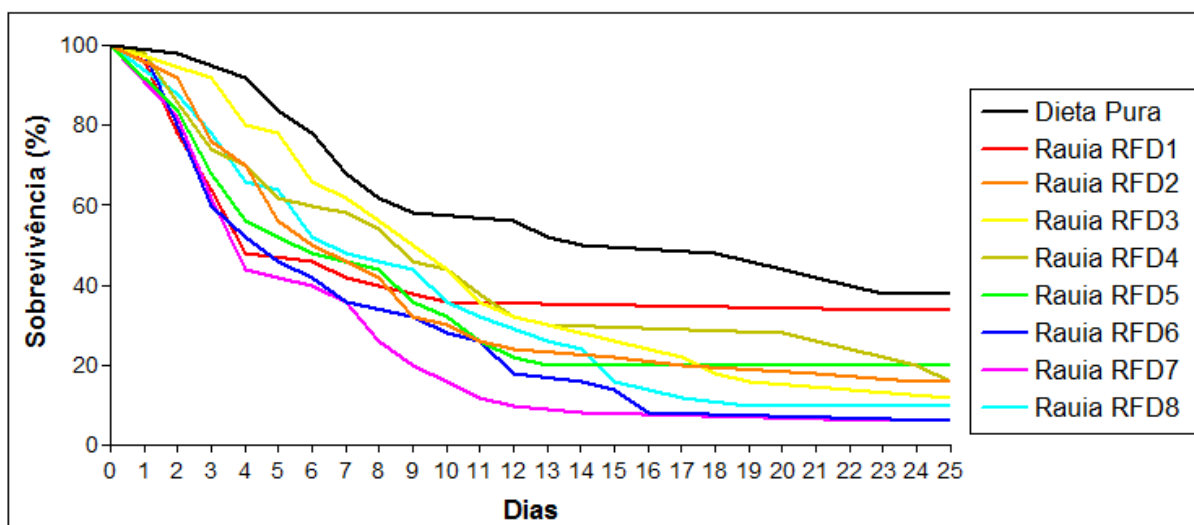


Figura 10. Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de frações do extrato bruto diclorometânico de folha de *Rauia* sp. na concentração 2,0 mg/mL.

Tabela 7. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de frações do extrato bruto diclorometânico de folha de *Rauia* sp. na concentração 2,0 mg/mL.

Fração	Mortalidade acumulada (%) por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	2	2	22	38	42	50	50	58	62	18 ^a
RFD 1	4	22	36	54	60	64	64	64	64	66	4 ^b
RFD 2	0	8	24	50	58	70	76	80	82	84	6,5 ^b
RFD 3	0	0	8	34	44	56	70	78	82	88	10 ^b
RFD 4	2	14	26	40	46	56	70	70	74	84	9 ^b
RFD 5	0	16	32	52	56	68	80	80	80	80	6 ^b
RFD 6	2	20	40	58	64	72	84	92	92	94	5 ^b
RFD 7	0	18	38	60	74	84	92	92	92	94	4 ^b
RFD 8	0	12	22	48	54	64	76	88	90	90	7 ^b

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

6.1.3. Partições do extrato bruto metanólico de folhas de *Rauia* sp.

Os resultados obtidos nos bioensaios por ingestão das partições do extrato bruto metanólico de folhas de *Rauia* sp., na concentração 2,0 mg/mL, estão representados através da Figura 11 e da Tabela 8 que contém a curva de sobrevivência, as porcentagens acumuladas de mortalidade diária, o respectivo valor mediano (Md) e a interpretação do teste “log-rank”.

A análise estatística mostrou que as partições diclorometânica (PFD) e hidroalcoólica (PFH) tiveram um potencial tóxico para o controle de *Atta sexdens rubropilosa*, sendo que a primeira teve um total de 100% de formigas mortas ao término do experimento, e no 3º dia de experimento, metade das operárias já estava morta. A partição obtida com o solvente acetato de etila não diferiu significativamente do controle com dieta pura

Neste caso, a amostra de menor polaridade (PFD) foi a que apresentou maior toxicidade para esses insetos.

O controle apresentou uma alta mortalidade ao fim do experimento, mas a mediana foi atingida somente no 11º dia, e não houve uma mortalidade alta logo nos primeiros dias do bioensaio, por isso os dados podem ser considerados confiáveis.

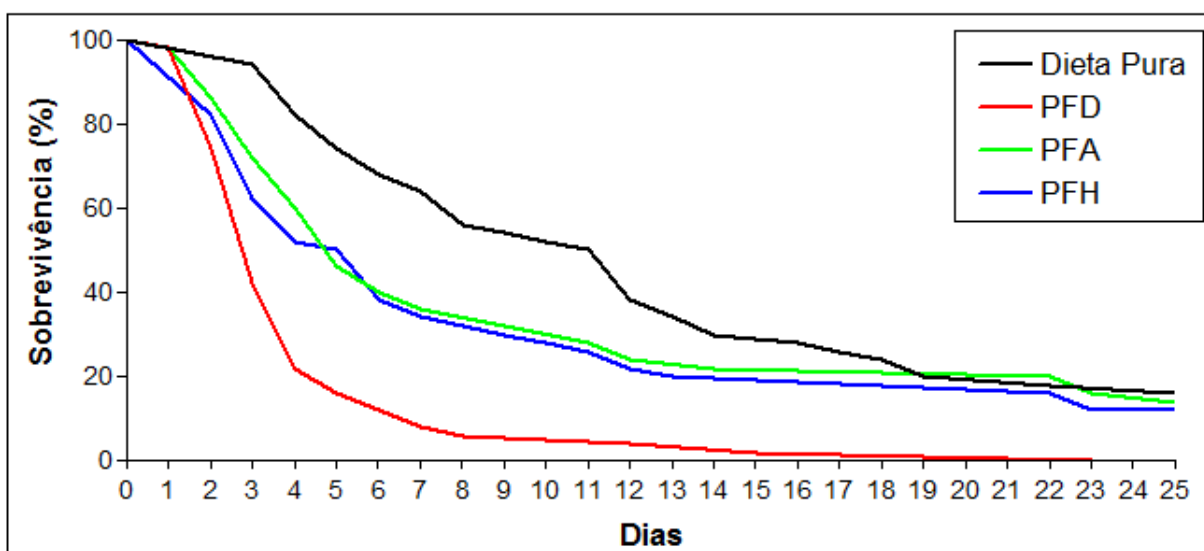


Figura 11. Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de partições do extrato bruto metanólico de folha de *Rauia* sp. na concentração 2,0 mg/mL.

Tabela 8. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de partições do extrato bruto metanólico de folha de *Rauia* sp. na concentração 2,0 mg/mL.

Partição	Mortalidade acumulada (%) por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	0	6	32	44	48	70	74	80	84	11a
PFD	2	26	58	88	94	94	96	98	98	100	3b
PFA	2	14	28	60	64	68	78	78	78	86	5a
PFH	0	18	38	62	68	72	80	80	82	88	6b

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

6.1.4. Extratos brutos de caule de *Rauia* sp.

Os extratos brutos de caule de *Rauia* sp. incorporados em dieta artificial provocaram diminuição na sobrevivência das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* em todos os solventes testados (Figura 12). Todos os tratamentos diferiram de forma significativa do controle com dieta pura. Houve mortalidade de 100% das formigas com os extratos obtidos com os solventes hexano e diclorometano. O extrato bruto metanólico causou uma mortalidade de 96% das operárias no final do experimento (Tabela 9). Como nos extratos brutos de folhas de *Rauia* sp., os extratos brutos do caule diclorometânico e metanólico apresentaram uma alta mortalidade para *Atta sexdens rubropilosa*. Por isso, esses dois extratos foram fracionados para a realização de novos bioensaios de toxicidade. Foram escolhidos esses dois extratos, e não o hexânico, pois apesar do extrato hexânico ter atingido uma mortalidade de 100%, ele não diferiu de maneira significativa do extrato metanólico, e já havia uma metodologia desenvolvida para o fracionamento do extrato metanólico. Optou-se por esses dois extratos brutos então, pois ambos foram tóxicos, e já havia uma metodologia desenvolvida para o fracionamento de ambos. As medianas dos tratamentos com os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico foram atingidas nos 5º, 2º e 6º dias de experimento, respectivamente (Tabela 9).

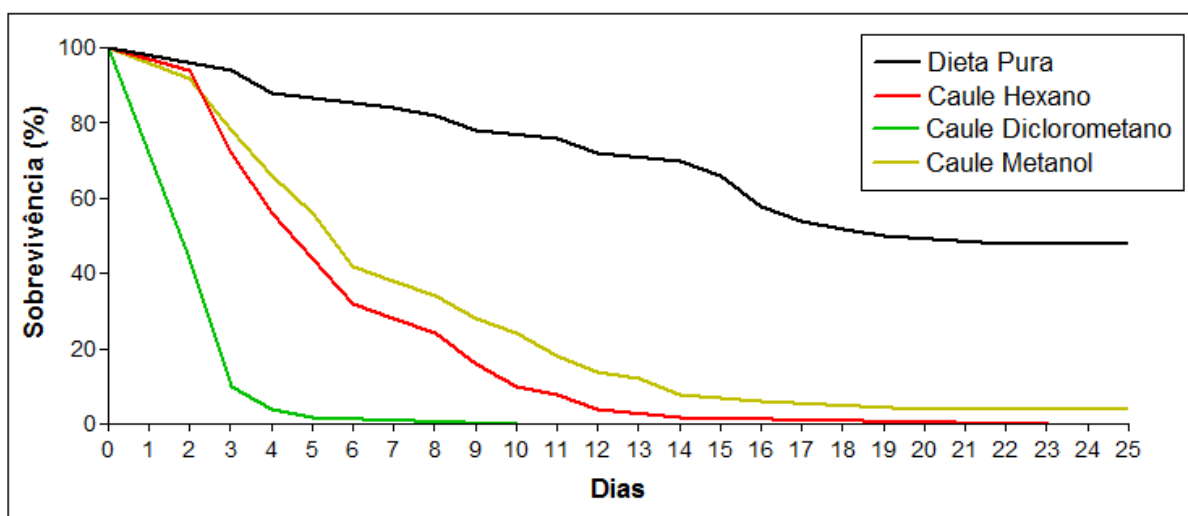


Figura 12. Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de extratos brutos de caule de *Rauia* sp. na concentração 2,0 mg/mL.

Tabela 9. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de extratos brutos de caule de *Rauia* sp. na concentração 2,0 mg/mL.

Extrato	Mortalidade acumulada (%) por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	0	6	12	18	22	30	46	50	64	19 _a
Hexano	0	6	28	68	76	90	98	98	98	100	5 _b
Diclorometano	0	56	90	98	98	100	100	100	100	100	2 _b
Metanol	0	8	22	56	66	76	92	94	96	96	6 _b

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

6.1.5. Frações do extrato bruto diclorometânico de caule de *Rauia* sp.

Na Figura 13 e na Tabela 10 constam os resultados obtidos nos bioensaios por ingestão das frações obtidas a partir do extrato bruto diclorometânico do caule de *Rauia* sp., também na concentração de 2,0 mg/mL. Os resultados consistem nas curvas de sobrevivência, nas porcentagens acumuladas de mortalidade diária, nos respectivos valores medianos (Md) e também na interpretação do teste “log-rank”.

As frações RCD 1, RCD 2 e RCD 3 não foram testadas, pois não foram obtidas em massas suficientes para a incorporação nas dietas artificiais usadas na manutenção das operárias na ausência do fungo simbiote.

Somente a fração RCD 4 apresentou mortalidade de 100%, com metade das formigas mortas no 5º dia de bioensaio. Todas as frações testadas apresentaram uma diferença significativa em relação ao controle com dieta pura.

A mortalidade acumulada (%) por dia teve um aumento gradativo durante o tempo de experimento. As frações de menor polaridade testadas, RCD 4 e RCD 5, apresentaram uma maior toxicidade para as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, atingindo uma mortalidade acima de 95% de formigas mortas, antes do fim do experimento.

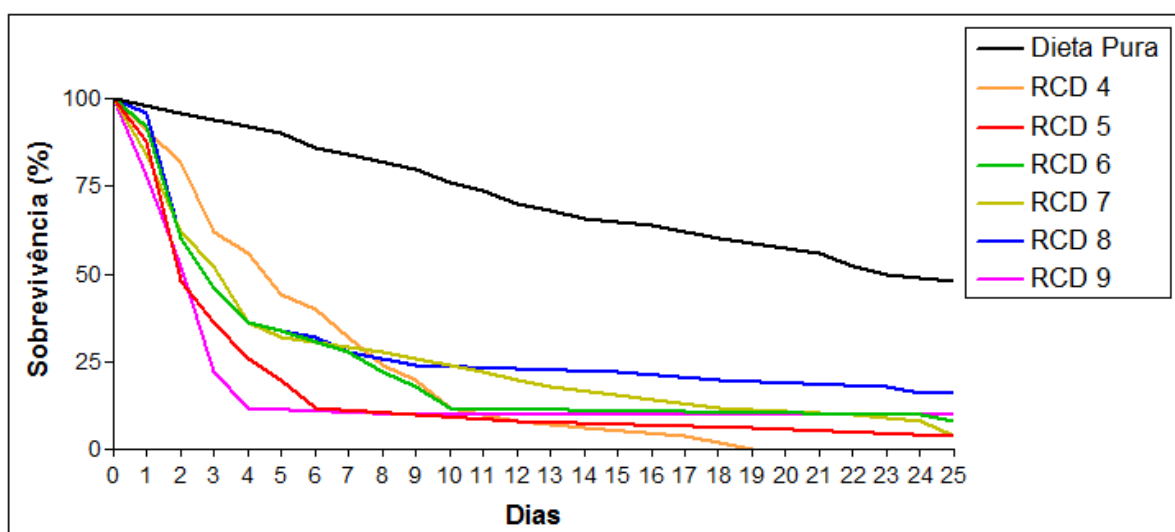


Figura 13. Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de frações do extrato bruto diclorometânico de caule de *Rauia* sp. na concentração 2,0 mg/mL.

Tabela 10. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de frações do extrato bruto diclorometânico de caule de *Rauia* sp. na concentração 2,0 mg/mL.

Fração	Mortalidade acumulada (%) por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	4	4	14	16	24	34	36	44	52	23a
RCD 4	0	18	38	60	72	88	94	96	100	100	5b
RCD 5	12	52	64	88	88	88	92	92	94	96	2b
RCD 6	8	40	54	66	78	88	88	88	88	92	3b
RCD 7	16	36	48	68	72	76	82	82	88	96	4b
RCD 8	4	40	54	68	72	76	72	78	80	84	3b
RCD 9	22	48	78	88	88	90	90	90	90	90	3b

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

6.1.6. Partições do extrato bruto metanólico de caule de *Rauia* sp.

Os resultados obtidos nos bioensaios por ingestão das partições do extrato bruto metanólico de caule de *Rauia* sp., na concentração 2,0 mg/mL, estão representados através da Figura 14 e da Tabela 11 que contém a curva de sobrevivência, as porcentagens acumuladas de mortalidade diária, o respectivo valor mediano (Md) e a interpretação do teste “log-rank”.

A análise estatística mostrou que a somente partição obtida com o solvente diclorometano (PCD) diferiu significativamente do controle com dieta pura, atingindo uma mortalidade de 100% de formigas mortas. A mediana, ou seja, metade de operárias mortas foi atingida no 4º dia de bioensaio.

Neste experimento, a amostra de menor polaridade (PCD) foi a única que apresentou toxicidade para *Atta sexdens rubropilosa*, de acordo com a interpretação do teste “log-rank”.

O controle apresentou uma alta mortalidade ao fim do experimento, mas a mediana foi atingida somente no 12º dia, e não houve uma mortalidade alta logo nos primeiros dias do bioensaio, por isso os dados podem ser considerados confiáveis.

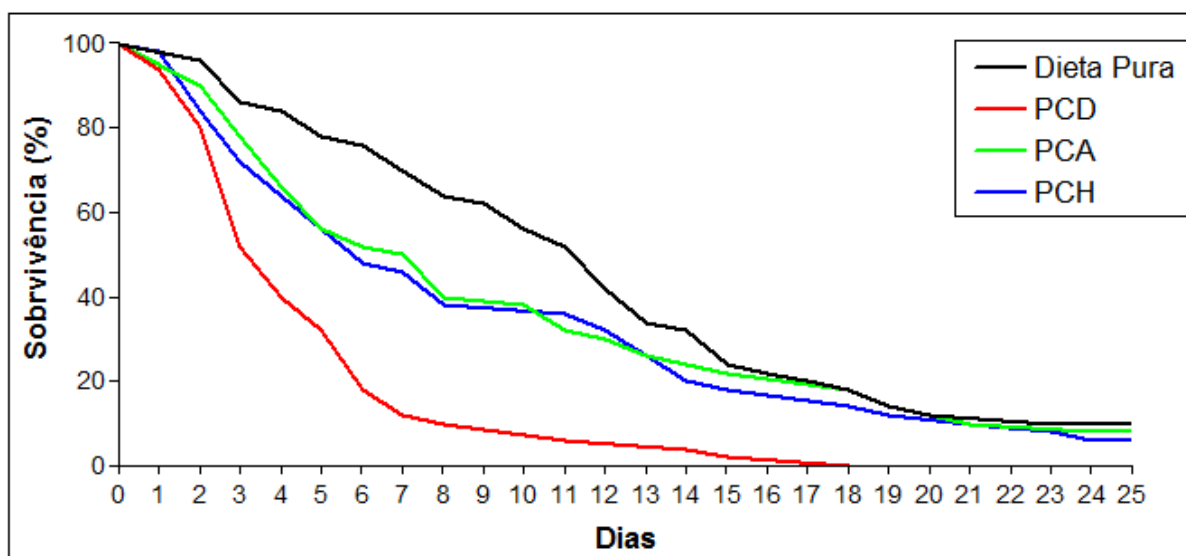


Figura 14. Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de partições do extrato bruto metanólico de caule de *Rauia* sp. na concentração 2,0 mg/mL.

Tabela 11. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de partições do extrato bruto metanólico de caule de *Rauia* sp. na concentração 2,0 mg/mL.

Substância	Mortalidade acumulada (%) por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	4	14	24	34	44	68	80	88	90	12a
PCD	6	20	48	82	90	90	96	98	100	100	4b
PCA	0	10	22	48	60	62	74	78	90	96	7,5a
PCH	2	16	28	52	62	62	80	82	90	94	6a

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

6.2. Testes de nebulização

6.2.1. Intoxicação das formigas

As formigas tratadas nos bioensaios de nebulização não apresentaram sintomas de intoxicação para nenhum extrato de *Rauia* sp. testado, comportando-se semelhantemente ao controle, que recebeu nebulização somente de óleo de soja.

As operárias ficaram agitadas durante a aplicação e transportaram as crias para outros locais do jardim de fungo, porém, após 24 horas da aplicação esse comportamento havia desaparecido.

6.2.2. Corte de folhas

Na Figura 15 estão representadas as porcentagens de folhas cortadas a partir de 24 horas de seu oferecimento.

Nas colônias tratadas com os extratos brutos metanólicos de folhas e caule de *Rauia* sp. o corte de folhas foi feito em menor proporção em comparação ao controle, e somente no primeiro dia após a aplicação de nebulização. A partir do segundo dia o corte foi paralisado.

A redução do corte de folhas pelas formigas nas colônias nebulizadas com os extratos brutos diclorometânicos de folhas e caule de *Rauia* sp. foi semelhante ao grupo controle. Nessas colônias, o corte de folhas não sofreu alteração ao longo do experimento, as formigas cortavam praticamente toda folha oferecida.

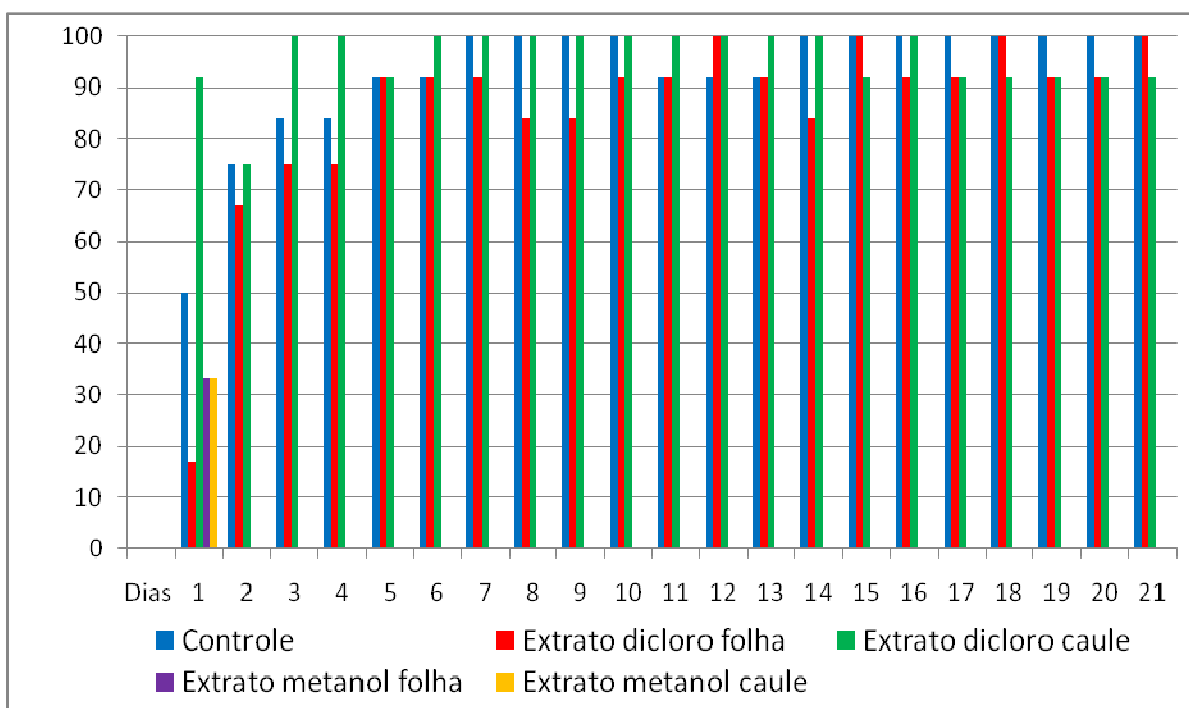


Figura15. Corte de folhas em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório e submetidas à nebulização com extratos brutos de folhas e caule de *Rauia* sp.

6.2.3. Mortalidade de formigas

Houve uma mortalidade alta nas colônias tratadas com os extratos brutos metanólicos, de folhas e de caule de *Rauia* sp., desde o início do bioensaio. Essa mortalidade chegou a 100% das operárias mortas nos dias 14 e 12 de experimento, respectivamente.

Nos tratamentos com extratos brutos diclorometânicos, folhas e do caule, houve uma mortalidade inicial de 25% de operárias mortas no dia seguinte à aplicação da nebulização, depois os ninhos se recuperaram ao longo do experimento, passados alguns dias.

Nas colônias do grupo controle também houve uma mortalidade de 25% das formigas no dia seguinte à aplicação da nebulização, depois os ninhos também se recuperaram, como no tratamento com extratos brutos diclorometânicos de folhas e caule, mas essa recuperação foi mais rápida e não houve mais morte de operárias até o final do bioensaio (Figura 16).

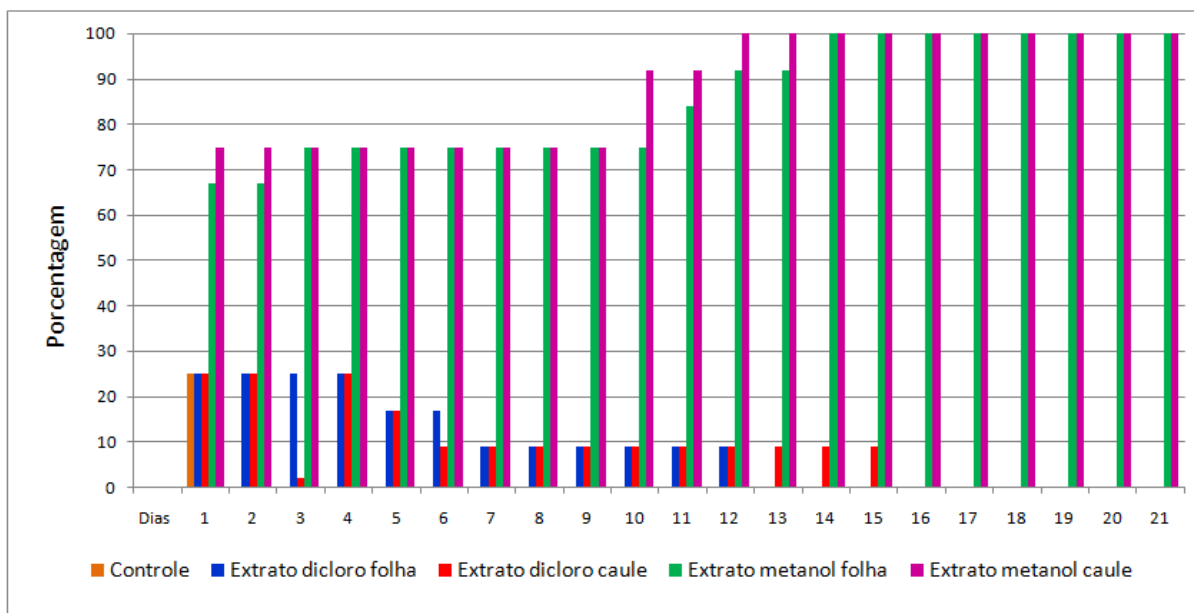


Figura16. Mortalidade de formigas em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório e submetidas à nebulização com extratos brutos de folhas e caule de *Rauia* sp.

6.2.4. Mudança de panela

Nas colônias tratadas com o extrato bruto diclorometânico do caule e com os extratos brutos metanólicos, tanto das folhas quanto do caule, as operárias mudaram o jardim de fungo e as crias de panela, transferindo-os para a panela de alimentação. Nas colônias tratadas com extrato bruto diclorometânico da folha de *Rauia* sp. e nas colônias do controle tratadas comente com óleo de soja não foi observada nenhuma mudança de panela.

6.2.5. Presença de fungo filamentososo

Nos tratamentos com extratos brutos metanólicos, de folhas e caule de *Rauia* sp., houve uma contaminação das colônias por fungos filamentosos, em uma ou mais panelas.

No tratamento por extrato bruto metanólico do caule de *Rauia* sp. a contaminação teve início no 3º de experimento, apresentando um fungo branco na panela de lixo. Esse fungo também ocorreu na panela do fungo simbiote e cresceu ao longo do experimento dentro da colônia. A contaminação foi de 100% no 11º dia do bioensaio.

Nas colônias em que foi aplicada a nebulização com extrato bruto metanólico da folha de *Rauia* sp. houve o aparecimento de um fungo filamentososo no 4º dia de experimento, na panela do fungo simbiote. Essa contaminação aumentou gradativamente até o 16º dia de bioensaio em que a contaminação era de 100% das colônias, com o fungo presente também na panela de lixo.

Nenhuma das colônias tratadas com os extratos brutos diclorometânicos, tanto das folhas quanto do caule, apresentou fungos filamentosos. O mesmo aconteceu com o grupo controle (Figura 17).

Não foi feita a identificação do fungo filamentososo presente nas colônias. Estima-se que seja um fungo do gênero *Escovopsis* pela morfologia bem característica do gênero.

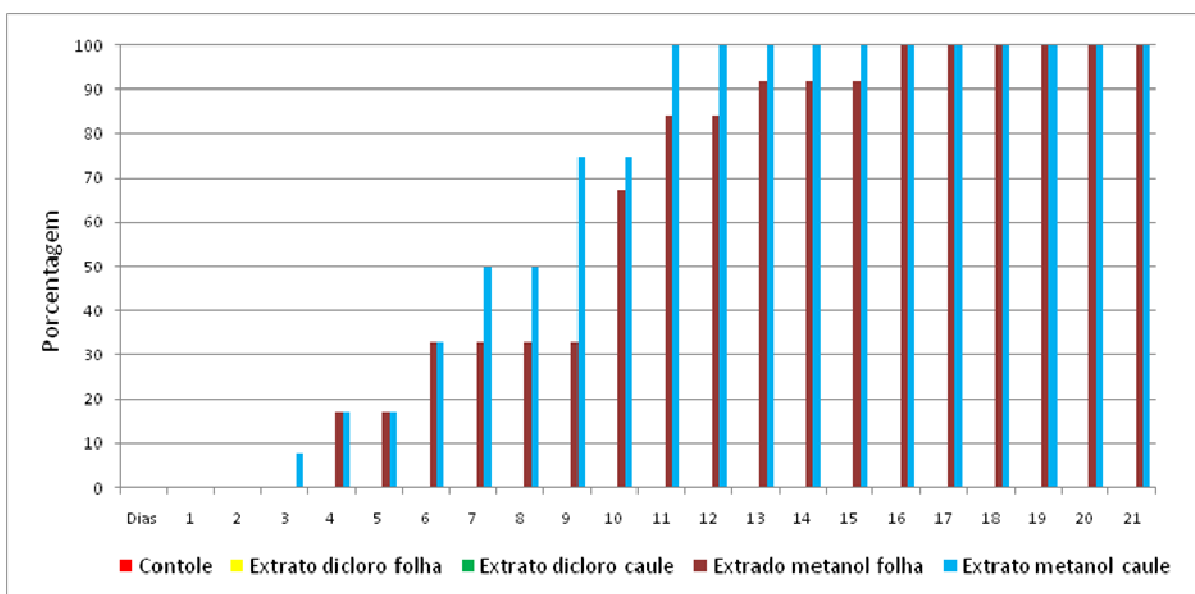


Figura17. Presença de fungos filamentosos em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório e submetidas à nebulização com extratos brutos de folhas e caule de *Rauia* sp.

6.2.6. Redução do jardim de fungo

Nas colônias nebulizadas com extratos brutos metanólicos, de folhas e de caule, o fungo regrediu muito, cerca de 75%, logo no primeiro dia do experimento, ficando com um aspecto de queimado (Figura 18). Em nenhuma dessas colônias o fungo se recuperou. No 17º dia de experimento, a redução foi de 100% nas colônias tratadas com extrato bruto metanólico das folhas. E nas colônias nebulizadas com extrato bruto metanólico do caule, a redução total do fungo ocorreu no 16º dia de bioensaio.

Não ocorreu redução no jardim de fungo nas colônias tratadas apenas com o óleo de soja (controle), como mostra a Figura 19, e nem nas colônias tratadas com os extratos brutos diclorometânicos das folhas e do caule de *Rauia* sp. (Figura 20).



Figura 18. Ninho incipiente de *Atta sexdens rubropilosa*, tratado com nebulização de extrato bruto metanólico de folha de *Rauia* sp., com redução do fungo simbiote.



Figura 19. Ninho incipiente de *Atta sexdens rubropilosa*, tratado com nebulização sem nenhum extrato bruto de *Rauia* sp. (controle), sem redução do fungo simbiote.



Figura 20. Ninho incipiente de *Atta sexdens rubropilosa*, tratado com nebulização de extrato bruto diclorometânico de folha de *Rauia* sp., sem redução do fungo simbiote.

6.2.7. Corte de fungo

Todas as colônias testadas com extratos brutos de caule e folhas de *Rauia* sp. apresentaram corte de fungo. As operárias cortaram pedaços do fungo simbiote e descartaram como lixo, na panela de lixo. A Figura 21 representa o corte de fungo do conjunto das colônias.

Esse comportamento pode indicar que as formigas interpretaram parte do fungo simbiote como inviável para alimentação, pela presença de uma substância tóxica por exemplo, e descartaram essa porção de fungo como lixo.

Nas colônias tratadas com extratos brutos metanólicos, tanto das folhas quanto do caule de *Rauia* sp., observa-se um aumento gradual do corte do fungo simbiote, desde o dia seguinte à nebulização até o 17º de experimento, em que 100% do fungo foi cortado, em ambos tratamentos.

As colônias tratadas com extrato bruto diclorometânico das folhas apresentou um corte de fungo inicial de 25% como no controle, e esse corte aumentou um pouco a partir do segundo dia, se mantendo até ao fim do bioensaio com 33% do fungo cortado. As colônias tratadas com extrato bruto diclorometânico do caule apresentaram um comportamento semelhante, sendo que a taxa de 33% do fungo cortado foi atingido no 6º de experimento, se mantendo assim até o fim do período do bioensaio.

No grupo controle foi observado um corte de fungo de 25% um dia após a aplicação da nebulização, depois esse corte foi paralisado.

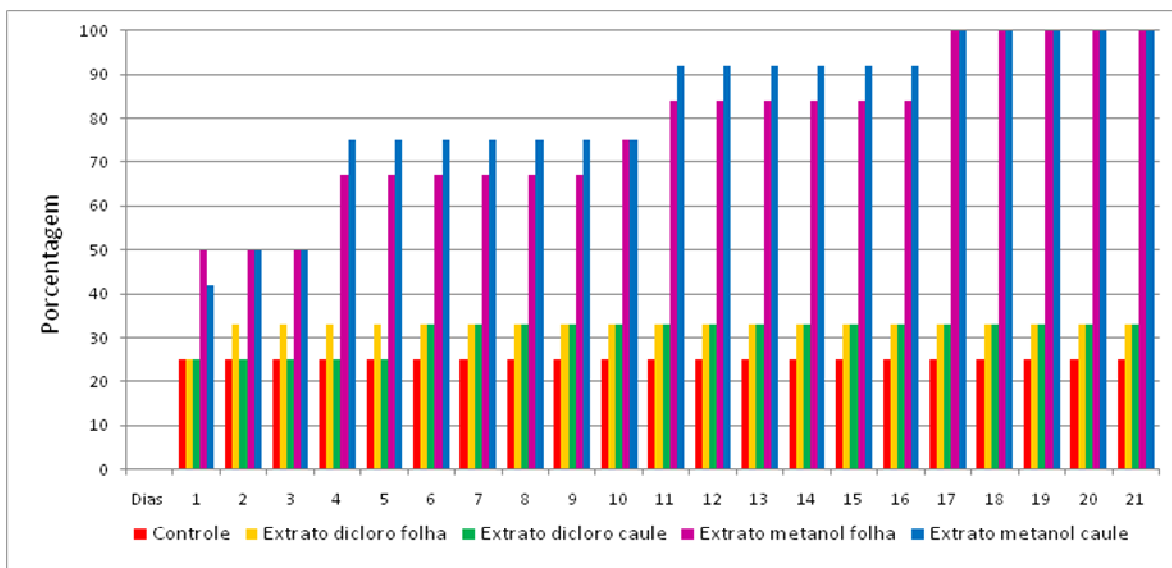


Figura 21. Corte do fungo simbiote em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório e submetidas à nebulização com extratos brutos de folhas e caule de *Rauia* sp.

7. DISCUSSÃO

As formigas cortam uma grande quantidade e variedade de vegetais, porém nem sempre na mesma intensidade. Elas são seletivas e exibem preferência a algumas espécies de plantas (HOWARD, 1988). Essa preferência deve-se, principalmente, aos fatores químicos, como terpenóides e alcalóides presentes nesses vegetais (HUBBELL et al., 1984). As plantas desenvolvem defesas químicas contra a herbivoria dos insetos por coevolução (EHRlich; RAVEN, 1964), e assim é criada uma complexa inter relação entre ambos. Isso tem feito aumentar o interesse na análise de seus constituintes químicos e seus efeitos sobre as formigas cortadeiras.

Segundo JACOBSON (1989), os derivados botânicos mais promissores estão presentes nas famílias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae e Canellaceae. Além disso, as famílias Lamiaceae e Myrtaceae também estão entre as plantas inseticidas com resultados notáveis devido, principalmente, a presença dos óleos essenciais (ISMAN, 2000).

A família Rutaceae tem sido estudada em diversas áreas por conter uma grande quantidade de metabólitos secundários. Muitos desses estudos são voltados para o controle de formigas cortadeiras. Substâncias presentes em algumas espécies dessa família, como limonóides isolados de caule de *Raulinoa echinata*, provocaram alta mortalidade em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (BIAVATTI et al., 2005). Outras espécies desse grupo já foram testadas contra o fungo simbionte de formigas cortadeiras e foi comprovada a toxicidade de algumas cumarinas presentes nesses vegetais (BIAVATTI et al., 2002; GODOY et al., 2005).

Os resultados do presente trabalho revelaram que extratos brutos e suas frações de folhas e caule de *Rauia* sp. possuem efeitos tóxicos para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Esses efeitos foram observados tanto nas frações obtidas a partir do extrato bruto diclorometânico de folhas quanto nas obtidas a partir do extrato bruto diclorometânico do caule. As frações mais polares da folha foram mais tóxicas e, por outro lado no caule, as frações menos polares foram as mais tóxicas. Isso pode evidenciar a presença de compostos diferentes nos extratos brutos diclorometânicos de folhas e caule. O mesmo fato não ocorreu com as partições obtidas a partir dos extratos brutos metanólicos, pois em ambos a partição mais tóxica foi a de menor polaridade, o que sugere que nos extratos brutos metanólicos de folhas e caules pode conter composições semelhantes. Essa hipótese poderá ser confirmada com futuras análises químicas, em que os compostos presentes nesse vegetal possam ser isolados e identificados.

A fração de menor polaridade obtida dos extratos brutos metanólicos (de folhas e caule) foi a fração diclorometânica. Em estudos anteriores, foi isolada e identificada uma cumarina nessa fração chamada rauianina, que é característica do gênero *Rauia* (FACHINNI, 2006). Esta cumarina já foi testada contra as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote, se mostrando muito tóxica a ambos (FACHINNI, 2006).

HILL; SCHOONHOVEN (1981) observaram que alguns ácidos graxos presentes nos óleos vegetais têm efeito inseticida para pragas de grãos armazenados. O modo de ação dos óleos vegetais sobre os insetos ainda não está totalmente elucidado. Existem trabalhos com insetos e ácaros sugerindo que o óleo atinge, principalmente, o sistema respiratório desses animais, interferindo na respiração normal e causando sufocamento que, conseqüentemente, causa a morte (DAVIDSON et al., 1991). Outros estudos revelaram que os óleos devem agir no sistema nervoso do inseto pelo aumento da permeabilidade da membrana do neurônio a troca de íons, causando acentuada excitabilidade das células nervosas (TAVERNER et al., 2001). A maioria dos inseticidas tem seu modo de ação ligado ao sistema nervoso. Alguns trabalhos na literatura consideram que a atividade inseticida dos óleos vegetais está relacionada, principalmente, com a composição de ácidos graxos (VARMA; PANDEY, 1978; MESSINA; RENWICK, 1983; DON PEDRO, 1990).

Estudos anteriores sobre a toxicidade de extratos vegetais para formigas cortadeiras revelaram resultados promissores. Frações de folhas de *Canavalia ensiformis* foram significativamente tóxicas para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (TAKAHASHI-DELBIANCO, 2002; MORINI, 2005). Sementes e folhas de *Sesamum indicum* também apresentaram os ácidos graxos como tóxicos às formigas em experimentos realizados em laboratório (RIBEIRO et al., 1998; HEBLING-BERALDO et al., 1984; BUENO et al., 1995, 2004a,b; MORINI et al., 2005).

A *Azadirachta indica*, popularmente conhecido como nim (neem), possui uma substância presente no óleo de alta polaridade muito tóxica aos insetos, a azadiractina, capaz de inibir a oviposição e o crescimento, diminuir o apetite e a fecundidade (SCHUMUTTERER, 1990). Extratos aquosos das folhas do nim já foram utilizados para o controle de *Spodoptera frugiperda* (PRATES et al., 2003). Também houve redução da sobrevivência de indivíduos de *Diaprepes abbreviatus* que foi alimentada com uma dieta que continha extratos de nim (WEATHERSBEE; TANG, 2002). Trabalhos com *Anastrepha fraterculus*, a mosca-da-fruta, revelaram que o nim possui uma ação tóxica contra esses insetos, reduzindo a postura e interferindo no desenvolvimento larval e pupal dos indivíduos (SALLES; RECH, 1999).

Em trabalhos realizados com formigas cortadeiras, o óleo bruto de *Azadirachta indica* apresentou toxicidade para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, quando oferecido na forma de ingestão, em bioensaios semelhantes aos do presente trabalho (SANTOS-OLIVEIRA, 2006). Por outro lado, ele não apresentou efeito tóxico para as colônias incipientes de formigas quando aplicado em forma de nebulização, nem em forma de iscas granuladas, ou seja, apresentou toxicidade à formiga, mas não suficiente para eliminar a colônia (SANTOS-OLIVEIRA, 2006).

O óleo bruto de *Carapa guianensis* é tóxico tanto para saúva-limão quanto para seu fungo simbiote (AMBROZIN, 2000; AMBROZIN et al., 2006). Em trabalhos anteriores pode-se verificar essa ação tóxica do óleo aplicado na forma de ingestão, e de aplicação tópica (SANTOS-OLIVEIRA, 2006).

Outras plantas apresentam efeito deletério para *Atta sexdens rubropilosa* verificado por estudiosos, como a *Ricinus communis* (TORKOMIAN, 1994; ACÁCIO-BIGI et al., 1998; ACÁCIO-BIGI et al., 2004). Estudos revelaram que esse vegetal é tóxico também para o fungo simbiote da saúva em concentrações baixas, de 5,0 mg/mL, e essa toxicidade se dá pela presença de ácidos graxos de longas cadeias saturadas (ACÁCIO-BIGI et al., 2004).

Indivíduos de colônias de *Atta sexdens* L. alimentadas diariamente com folhas de *Ipomoea batatas* tiveram interferência em seu metabolismo respiratório com o aumento da taxa respiratória sugerindo a ocorrência de efeitos fisiológicos nos adultos dessas formigas (HEBLING et al., 2000b). Além disso, em colônias alimentadas com folhas de *I. batatas* há a inibição do crescimento do fungo (HEBLING et al., 2000b). Utilizando uma metodologia semelhante à do presente trabalho, BUENO (2002) observou uma mortalidade significativa de formigas nos bioensaios com *Cedrela fissilis*, indicando a presença de substância(s) tóxica(s) nessa planta (BUENO et al., 2005).

Efeitos tóxicos também foram observados por extratos orgânicos obtidos a partir de frutos, galhos e folhas da espécie vegetal *Cipadessa fruticosa* sobre as formigas cortadeiras, além de inibir em 80% o desenvolvimento de seu fungo simbiote (LEITE et al., 2005).

Alguns óleos brutos de plantas como *E. guineensis*, *R. communis* e *S. indicum*, revelaram toxicidade para as formigas cortadeiras em bioensaios por ingestão, mas não apresentam intoxicação nas formigas, nem redução do ninho quando aplicados em forma de nebulização (SANTOS-OLIVEIRA, 2006). Segundo HILL; SCHOONHOVEN (1981), a ação tóxica de *E. guineensis* pode ser devido a frações de triglicerídeos presentes nesse vegetal.

O óleo bruto da planta *Anacardium occidentale* foi tóxico para a formiga *Atta sexdens rubropilosa* tanto na forma de ingestão, quanto na forma de aplicação tópica (SANTOS-

OLIVEIRA, 2006). Esse óleo não se mostrou tóxico quando foi incorporado em iscas granuladas em experimentos anteriores (SANTOS-OLIVEIRA, 2006). Quando aplicado em bioensaios, sobre a forma de nebulização, o óleo bruto causou um aumento na mortalidade das operárias, como o extrato bruto diclorometânico de *Rauia* sp.. Fungos filamentosos foram verificados nas colônias tratadas com esse óleo e com os extratos de *A. occidentale*, e esse aparecimento se deve provavelmente ao enfraquecimento das barreiras de defesa da colônia e à debilitações ocasionadas pela aplicação desse tratamento (SANTOS-OLIVEIRA, 2006).

Resultados semelhantes foram observados no presente trabalho. Os ninhos nebulizados com os extratos brutos de folhas e de caule de *Rauia* sp. obtidos com o solvente metanol apresentaram o jardim de fungo totalmente contaminado por outros fungos, o que levou à extinção ao longo do experimento. A presença de fungos filamentosos, como o *Escovopsis*, que são parasitas antagonistas do fungo simbiote das formigas cortadeiras, causa grandes impactos às condições e à sobrevivência dos ninhos, pois diminuem a taxa de crescimento do fungo simbiote e reduz a sobrevivência das formigas (CURRIE, 2001 a; 2001 b). A cumarina rauianina está presente no extrato bruto metanólico de *Rauia* sp. e ela é tóxica tanto à formiga cortadeira quanto ao seu fungo simbiote (FACHINNI, 2006). Bioensaios anteriores revelaram que essa cumarina reduziu a sobrevivência do fungo simbiote da formiga em 100% (FACHINNI, 2006), como aconteceu também no presente trabalho.

A toxicidade do óleo e de extratos da castanha *A. occidentale* foi relatado por MENDONÇA et al. (2005) em estudos com larvas do mosquito *Aedes aegypti*, em que foi verificada uma alta mortalidade para as larvas desse inseto. Cerca de 70% dos constituintes presentes na casca da castanha de caju são os ácidos anacárdicos, compostos fenólicos biosintetizados a partir de ácidos graxos (AGOSTINI-COSTA et al., 2005).

Os efeitos tóxicos dos extratos brutos e frações de folhas e caule de *Rauia* sp. verificados no presente trabalho devem estar relacionados à composição desses extratos. Os ácidos graxos, as cumarinas, as lignanas, os terpenóides são exemplos de compostos que possuem uma grande atividade biológica, e podem estar ligados diretamente à toxicidade dos vegetais sobre os insetos. Existe a necessidade de novos estudos a fim de isolar, e identificar os compostos que apresentem toxicidade às formigas.

A continuidade dessa linha de trabalho realizado por BONDANCIA (2009) envolveu a realização de um estudo fitoquímico dos extratos e frações de *Rauia* sp. que revelou a presença de esteróides, sesquiterpenos, cumarinas, ácidos graxos, alcalóides, e flavonóides glicosilados como possíveis responsáveis pela atividade tóxica às saúvas. Até o momento, não

foi possível a realização de novos testes, pois não se obteve massa suficiente dos grupos de compostos identificados.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Metabólitos secundários presentes nas folhas e no caule de *Rauia* sp. apresentaram atividade tóxica para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* diminuindo sua longevidade, como evidenciado em bioensaios por ingestão (“in vitro”).

Os testes de nebulização (“in vivo”) confirmaram a presença de ação deletéria dos extratos e frações de *Rauia* sp. ao saubeiro como um todo uma vez que levou à extinção em poucos dias.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACÁCIO-BIGI, M. F. M.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. B.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Toxicidade de extratos foliares de *Ricinus communis* L. para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 41, n. 2-4, p. 239-243, 1998.

ACÁCIO-BIGI, M. F. M.; TORKOMIAN, V. L. V.; GROOTE, S. T. C. S.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. **Pest Management Science**, v.60, p.933-938, 2004.

AGOSTINI-COSTA, T. S.; JALES, K. A.; OLIVEIRA, M. E. B.; GARRUTI, D. S. **Determinação espectrofotométrica de ácido anacárdico em amêndoas de castanha do caju**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2005.

ALMEIDA, W. F.; PUGA, F. R. Poluição por fertilizantes e praguicidas. **Inter-facies escritos e documentos**, v. 11, p. 1-22, 1979.

AMANTE, E. Preliminary observation on the swarming behavior of the leaf-cutting ant, *Atta capiguara* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, v. 47, n. 1, p. 15-27, 1972.

AMBROZIN, A. R. P. **Química e atividade inseticida do óleo de *Carapa guianensis* e folhas de *Canavalia ensiformis***. 2000. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; SILVA, M. F. G. F.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI, M. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 542-547, 2006.

ANDRADE, A. P. **Comportamento forrageiro e aprendizado de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (Hymenoptera: Formicidae) em condições de campo e laboratório**. 1997. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ANDRADE, A. P. 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 symbiotic fungus culture. **Sociobiology**, v. 40, n. 2, p. 1-14, 2002.

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

BIGI, M. F.; TORKOMIAN, V. L.; GROOTE, S. T. de; HEBLING, M. J.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. **Pest Management Science**, v. 60, n. 9, p. 933-938, 2004.

BIVATTI, M. W.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VICTOR, S. R.; PAGNOCCA, F. C.; ALBUQUERQUE, S.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and x-ray structure of flindersiamine. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 1, p. 66-70, 2002.

BIAVATTI, M. W.; WESTERLON, R.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; PEÑAFLORES, M. F. G. V.; BUENO, O. C.; ELLENA, J. Leaf-cutting ants toxicity of limonexic acid and degraded limonoids from *Raulinoa echinata*. X-ray structure of epoxy-fraxinellone. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1443-1447, 2005.

BONDANCIA, T. M. **Estudo fitoquímico de *Rauia* sp. e atividades sobre formigas cortadeiras e sobre a lagarta-do-cartucho do milho**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

BONONI, V. L.; AUTUORI, M.; ROCHA, M. B. *Leucocoprinus gongylophorus* (Möller) Heim, o fungo do formigueiro de *Atta sexdens rubropilosa* Forel. **Rickia**, v. 9, p. 93-97, 1981.

BUENO, F. C. **Toxicidade de extratos da planta *Cedrela fissilis* Vell. para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae)**. 2002. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

BUENO, F. C.; GODOY, M. P.; LEITE, A. C.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; HEBLING, M. J. A.; BACCI, M.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of *Cedrela fissilis* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus. **Sociobiology**, v. 45, n. 2, p. 389-399, 2005.

BUENO, O. C.; HEBLING-BERALDO, M. J. A.; CASTRO, S. R. L.; da SILVA, O. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Toxic effect of plants on leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. In: VANDER MEER, R. K.; JAFFE, K.; CEDENO, A. **Applied Myrmecology: a world perspective**. Boulder: São Francisco & Oxford Westview Press, 1990. p. 420-426.

BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A.; MATENHAUER, A. M. C. Effect of sesame (*Sesamum indicum* L) on nest development of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 119, n. 1-5, p. 341-343, 1994.

BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A.; MATENHAUER, A. M. C. Effect of sesame (*Sesamum indicum* L) on nest development of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 119, n. 1-5, p. 341-343, 1995.

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 dietas artificiais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 1, p. 107-113, 1997.

BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; BROCHINI, J.; SINHORI, K.; MORINI, M. S. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; LEITE, A. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Activity of sesame leaf extracts to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 44, n. 3, p. 511-518, 2004a.

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

CHERRETT, J. M. The foraging behavior of *Atta cephalotes* L. (Hymenoptera, Formicidae). **Journal of Animal Ecology**, v. 37, n. 2, p. 387-403, 1968.

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

CHIU, S. F. Recent advances in research on botanical insecticides in China. In: ARNASON, J. T.; PHILOGÈNE, B. J. R.; MORAND, P. **Insecticides of plant origin**. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 69-77.

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

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

DAVIDSON, N. A.; DIBBLE, J. E.; FLINT, M. L.; MARER, P. J.; GUYE, A. **Managing insects and mites with spray oils**. Oakland: University of California Division of Agriculture and Natural Resources Publication, 1991.

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

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

DINIZ, E. A. **Comportamentos de preparação do substrato vegetal e cuidado com a rainha de *Atta sexdens***. 2000. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

DINIZ, E. A.; BUENO, O. C. Substrate preparation behaviors for the cultivation of the symbiotic fungus in leaf-cutting ants of the genus *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 53, n. 3, p. 651-666, 2009.

DON PEDRO, K.N. Insecticidal activity of fatty acid constituents of fixed vegetable oils against *Callosobruchus maculatus* (F.) on cowpea. **Pesticide Science**, v. 30, n. 3, p. 295-302, 1990.

DOW AGROSCIENCES. **Controle de formigas cortadeiras**. São Paulo: Folheto, 1998.

EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**, v. 18, n. 4, p. 586-608, 1964.

FACCHINI, P. H. **Química biomonitorada de *Protium heptaphyllum*, *Tapirira guianensis*, *Rauia* sp., *Conchocarpus longifolius*: atividades de extratos e constituintes isolados contra bactérias, saúva limão e seu fungo simbiote**. 2005. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Programa de Pós Graduação em Química, UFSCar, São Carlos.

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

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

GODOY, M. F. P.; VICTOR, S. R.; BELLINI, A. M.; GUERREIRO, G.; ROCHA, W. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR, M.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; PAGNOCCA, F. C. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3B, p. 669-672, 2005.

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

HARVEY MOTULSKY, M. D. **Intuitive biostatistics**. New York: Oxford University Press, 1995.

HEBLING, M. J. A. ; MAROTI, P. S. ; BUENO, O. C. ; da SILVA, O. A. ; PAGNOCCA, F. C. Toxic effects of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) to laboratory nests of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 86, n. 3, p. 253-256, 1996.

HEBLING, M. S. C.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; da SILVA, O. A; MAROTI, P. S. Toxic effects of *Canavalia ensiformis* L. (Leguminosae) on laboratory colonies of *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 124, n. 1, p. 33-35, 2000a.

HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; MAROTI, P. S.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A. Effects of leaves of *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) on nest development and on respiratory metabolism of leaf-cutting ants *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 124, n. 5-6, p. 249-252, 2000b.

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

HILL, J.; SCHOONHOVEN, A. V. Effectiveness of vegetable oil fractions in controlling the mexican bean weevil on stored beans. **Journal of Economic Entomology**, v. 74, n. 4, p. 478-479, 1981.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

HOWARD, J. J. Leafcutting ant diet selection: relative influence of leaf chemistry and physical features. **Ecology**, v. 69, n. 1, p. 250-260, 1988.

HOWARD, J. J.; CAZIN, J. Jr.; WIEMER, D. F. Toxicity of terpenoid deterrents to the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* and its mutualistic fungus. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, n. 1, p. 59-69, 1987.

HUBBEL, S. P.; WIEMER, D. F. Host plant selection by an Attine ant. In: JAISSON, P. **Social insects in the tropics**. Paris: Université Paris Nord, v. 2, p. 133-154, 1983.

HUBBELL, S. P.; HOWARD, J. J.; WIEMER, D. F. Chemical leaf repellency to an Attine ant: seasonal distribution among potential host plant species. **Ecology**, v. 65, n. 4, p. 1067-1076, 1984.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, p. 603-608, 2000.

JACOBSON, M. Botanical pesticides past, present and future. In: ARNASON, J. T.; PHILOGÈNE, B. J. R.; MORAND, P. **Insecticides of plant origin**. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 1-10.

JAFFE, C. K. **El mundo de las hormigas**. Universidad Simon Bolivar: Editorial Equinoccio, 1993.

JUSTI JUNIOR, J.; IMENES, S. de L.; BERGMANN, E. C.; CAMPOS-FARINHA, A. E. de C.; ZORZENON, F. J. **Formigas cortadeiras**. São Paulo, Instituto Biológico, 1996, 31p. (Boletim Técnico n. 4).

KENNARD, C. P. Control of leaf-cutting ants (*Atta* spp.) by fogging. **Experimental Agriculture**, v. 1, n. 3, p. 237-240, 1965.

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

LARANJEIRO, A. J.; LOUZADA, R. M. Manejo de formigas cortadeiras em florestas. **Série técnica IPEF**, v. 13, n. 33, p. 115-124, 2000.

LEITE, A. C.; OLIVEIRA, C. G.; GODOY, M. P.; BUENO, F. C.; de OLIVEIRA, M. D. S. D.; FORIM, M. R.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI, M. Toxicity of *Cipadessa fruticosa* to the leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and their symbiotic fungus. **Sociobiology**, v. 46, n. 1, p. 17-26, 2005.

LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. M. Variability in the selection of substrate by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bulletin of Entomological Research**, v. 65, n. 1, p. 33-47, 1975.

LOECK, A. E.; NAKANO, O. O efeito de novas substâncias visando o controle de saúveiros novos de *Atta laevigata* (Smith, 1958) (Hymenoptera: Formicidae). **O solo**, v. 1, p. 25-30, 1984.

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

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. São Paulo: Nobel, 1976.

MENDONÇA, F. A. C.; SILVA, K. F. S.; SANTOS, K. K.; RIBEIRO JR., K. A. L.; SANT'ANA, A. E. G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 629-636, 2005.

MESSINA, F. J.; RENWIK, J. A. A. Effectiveness of oils in protecting stored cowpeas from the cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 76, n. 3, p. 634-636, 1983.

MESTER, I. Structural diversity and distribution of alkaloids in the Rutales. In: WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. **Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales**. Londres: Academic Press, 1983. p. 31-96.

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**, v. 45, n. 1, p. 195-204, 2005.

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

PEREIRA DA SILVA, V. Contribuição ao estudo das populações de *Atta sexdens rubropilosa* Forel e *Atta laevigata* (Fr. Smith) no estado de São Paulo (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Entomologica**, v. 18, n. 1-4, p. 201-250, 1975.

PRATES, H. T.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. Atividade de extrato aquoso de nim (*Azadirachta indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 437-439, 2003.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, v. 2, n. 2, p. 161-170, 1997.

REMBOLD, H. The azadirachtins – potent insect growth inhibitors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 61-66, 1987.

RIBEIRO, S. B.; PAGNOCCA, F. C.; VICTOR, S. R.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; BACCI JR, M.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Activity of sesame leaf extracts against the symbiotic fungus of *Atta sexdens* L. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n. 3, p. 421-426, 1998.

RONHEDE, S.; BOOMSMA, J. J.; ROSENDAHL, S. Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens. **Mycological Research**, v. 108, n. 1, p. 101-106, 2004.

ROCKWOOD, L. L. The effects of seasonality of foraging in two species of leaf-cutting ants (*Atta*) (Hymenoptera: Formicidae) in Guanacaste Province, Costa Rica. **Biotropica**, v. 7, n. 3, p. 176-193, 1975.

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

SALLES, L. A.; RECH, N. L. Efeitos de extrato de nim (*Azadirachta indica*) e cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (WIED.) (Diptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 3, p. 225-227, 1999.

SANTOS-OLIVEIRA, M. F. S. **Controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) com produtos naturais**. 2006. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

SANTOS-OLIVEIRA, M. S. F.; BUENO, O. C.; MARINI, T.; REISS, I. C.; BUENO, F. C. Toxicity of *Azadirachta indica* to Leaf-cutting Ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Califórnia, v. 47, n. 2, p. 423-432, 2006.

SCHADE, F. H. The ecology and control of the leaf-cutting ants of Paraguay. In: GORHAM, J. R. **Paraguay: ecological essays**. Miami: Academy of the Arts and Sciences of the Americas, 1973. p.77-95.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 271-297, 1990.

STRADLING, D. J. The influence of size on foraging in the ant, *Atta cephalotes*, and the effect of some plants defense mechanisms. **Journal of Animal Ecology**, v. 47, n. 1, p. 173-188, 1978.

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

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. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

TAVERNER, P. D.; GUNNING, R. V.; KOLESIK, P.; BAILEY, P. T.; INCEOGLU, A. B.; HAMMOCK, B.; ROUSH, R. T. Evidence for direct neural toxicity of a “light” oil on the peripheral nerves of Lightbrown Apple Moth. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 69, p. 153-165, 2001.

TORKOMIAN, V. L. V. **Plantas e formigas cortadeiras: efeitos de extratos de *Ricinus communis* e de *Canavalia ensiformis* sobre o fungo simbiote de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908**. 1994. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

VARMA, B. K.; PANDEY, G. P. Treatment of stored greengram seed with edible oils of protection from *Callosobruchus maculatus* (Fabr.). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 48, n. 2, p. 72-75, 1978.

VELOSO, E. S. **Fitoquímica comparada dos Gêneros *Angostura*, *Almeidea* e *Rauia* (Rutaceae)**. 1995. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

VELOSO, E. S.; OLIVEIRA, D. J.; ARRUDA, A. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. DA.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Rauianin, a new coumarin from *Rauia resinosa*. **Natural Product Research**, v. 9, n. 4, p. 237-244, 1997.

VENDRAMIM, J. D. Plantas inseticidas e controle de pragas. **Informativo da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, n. 2, p. 1 e 5, 2000.

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

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

WALLER, D. A. The foraging Ecology of *Atta texana* in Texas. In: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder and London: Westview Press, 1986. p. 146-158.

WARTCHOW, F. **A família Agaricaceae Fr. (Agaricales, Basidiomycota) em áreas de mata atlântica na região metropolitana de Recife – Pernambuco, Brasil**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

WATERMAN, P. G. Alkaloids of the rutaceae: their distribution and systematic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 3, n. 3, p. 149-180, 1975.

WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. **Chemistry and Chemical Taxonomy of Rutales: Annual Proceedings of the Phytochemical society of Europe Number 22**. New York: Academic Press, 1983.

WEATHERSBEE, A. A.; TANG, Y. Q. Effect of neem seed extract on feeding, growth, survival, and reproduction of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 4, p. 661-667, 2002.

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

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

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). **Behavior Ecology and Sociobiology**, v. 7, n. 2, p. 157-165, 1980.

WILSON, E. O. The defining traits of fire ants and leaf-cutting ants. In: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder and London: Westview Press, 1986. p. 1-9.

Tais Garcia Freitas

Tais Garcia Freitas
(Aluna)

Odair Correa Bueno

Odair Correa Bueno
(Orientador)

Rio Claro

Setembro/2010